

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Rozdíly v charakteristických vlastnostech a funkcích
invariantních NKT buněk zdravých dárců**

Diplomová práce

Bc. Karolína Dostálová

Školitelka: Mgr. Monika Holubová, Ph.D.

České Budějovice 2019

Dostálová K., 2019: Rozdíly v charakteristických vlastnostech a funkcích invariantních NKT buněk zdravých dárců [Differences in characteristics and functions of invariant NK T-cells of healthy donors. Master Thesis, in Czech.] - 77 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: iNKT cells are a subset of T cells, they express the same phenotypic markers usually found on T and natural killer (NK) cells. They comprise a lineage of CD1d-restricted glycolipid-reactive T lymphocytes which have an important role in immunity. They play critical role in the regulation of many different types of immune responses, ranging from self-tolerance and development of autoimmunity to responses to pathogens and tumors. These cells are gaining increasing importance in health care, particularly in hematooncology. In this study we examined the essential features and functions of Invariant Natural killer T cell (iNKT cells). iNKT cells were isolated from mononuclear cells (MNCs) of healthy donors. Then they were cultured under appropriate conditions *in vitro*. After reaching sufficient concentration and purity the iNKT cells were used for cytotoxic and immunomodulatory assays and immunophenotype determination. Our results showed that iNKT cells have varying qualities across donors and that they have a heterogeneous immunophenotype, cytotoxic and immunomodulatory potential.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 9. 12. 2019

.....

Bc. Karolína Dostálová

Poděkování: V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Monice Holubové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, poskytnutí cenných rad a pomoc při zpracování výsledků této diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala Doc. MUDr. Danielu Lysákovi, Ph.D. za umožnění provedení praktické části práce v prostorách laboratoří Hematologicko-onkologického oddělení ve Fakultní nemocnici Plzeň a celému kolektivu této laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji také panu Bc. Martinovi Lebovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Vývoj a vlastnosti krevních elementů	1
1.1.1	Kostní dřev	1
1.1.2	Vývoj krevních elementů a jejich základní dělení	2
1.1.3	CD klasifikace	4
1.2	Invariantní NK T-lymfocyty	5
1.2.1	Vývoj a rozdělení iNKT buněk	6
1.2.2	Klíčové molekuly pro aktivaci iNKT buněk	6
1.2.2.1	Invariantní NKT buněčný receptor (iTCR)	7
1.2.2.2	CD1d molekula	7
1.2.2.3	Receptor NKG2D	9
1.2.2.4	L-selektin (CD62L)	10
1.2.3	Funkce iNKT buněk	10
1.2.3.1	Produkce cytokinů	10
1.2.3.2	Přímá cytotoxická aktivita	11
1.2.4	Role iNKT buněk v patofyziologických procesech	12
1.2.4.1	Význam iNKT buněk při regulaci imunity	12
1.2.4.1.1	iNKT a reakce štěpu proti hostiteli	12
1.2.4.1.2	iNKT a alergie	14
1.2.4.1.3	iNKT a autoimunitní onemocnění	14
1.2.4.2	Význam iNKT buněk u nádorů	15
1.2.4.3	Význam iNKT buněk u infekčních onemocnění	17
2	Cíle práce a hypotéza	18
3	Materiál a metody	19
3.1	Seznam použitého materiálu a reagensů	19
3.2	Obecné schéma práce s invariantními NK T-buňkami	21

3.3	Izolace mononukleárních buněk	21
3.4	Zamrazení buněk	21
3.5	Rozmrazení buněk	22
3.6	Izolace iNKT buněk (magnetická separace)	22
3.7	Měření čistoty iNKT buněk na průtokovém cytometru	24
3.8	Obecný postup přípravy vzorků a jejich měření na průtokovém cytometru	24
3.9	Nasazení kultury iNKT buněk na kultivační destičku	24
3.10	Kultivace a zamrazení iNKT buněk	25
3.11	Rozmrazení iNKT buněk a jejich rekultivace	25
3.12	Stanovení imunofenotypu	25
3.13	Značení nádorových buněčných linií CFSE próbou	26
3.14	Cytotoxické testy	27
3.15	Imunomodulační testy	28
3.16	Zpracování dat	30
4	Výsledky	31
4.1	Izolace a kultivace iNKT buněk	31
4.2	Imunofenotyp iNKT buněk	32
4.3	Cytotoxické testy	34
4.4	Imunomodulační testy	38
5	Diskuze	44
6	Závěr	48
7	Seznam použitých zkratk	49
8	Seznam použité literatury	51

Přílohy

1 Úvod

1.1 Vývoj a vlastnosti krevních elementů

Hematologie se zabývá studiem krve a všech jejích složek. Hematopoéza neboli krvetvorba vede ke vzniku, vývoji a specializaci všech funkčních krevních buněk, které jsou uvolňovány z kostní dřeně do krevního oběhu. Všechny krevní buňky vznikají z hematopoetické kmenové buňky. Existují tři kategorie krevních buněk: erytrocyty (červené krvinky), leukocyty (bílé krvinky) a trombocyty (krevní destičky) (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016).

1.1.1 Kostní dřeň

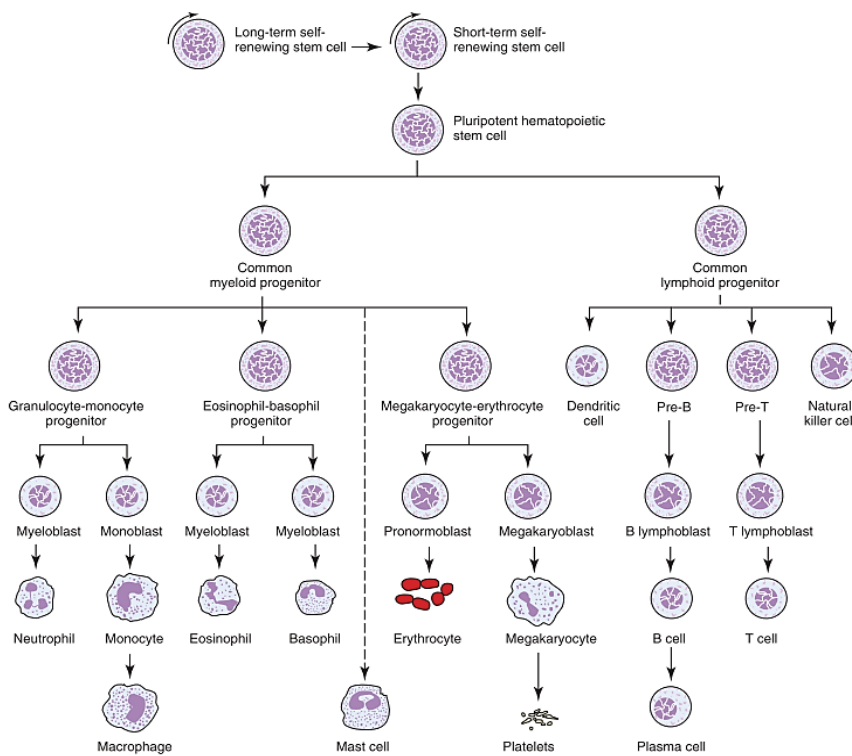
Kostní dřeň je hlavní hematopoetický orgán a primární lymfoidní tkáň zodpovědná za tvorbu erytrocytů, granulocytů, monocytů, lymfocytů a krevních destiček. Kostní dřeň se nachází v centrálních dutinách axiálních a dlouhých kostí. Hematopoéza musí být podporována mikroprostředím, které je schopné rozpoznávat a udržovat hematopoetické kmenové buňky a poskytovat příslušné faktory (např. cytokiny), potřebné k podpoře proliferace, diferenciaci a zrání kmenových buněk. Některé humorální faktory působí na primitivnější buňky a mají obecný účinek, zatímco jiné (např. erythropoetin) působí na pozdější progenitory specifické buněčné linie. (Gregory S. Travlos, 2006).

Normální kostní dřeň obsahuje dvě hlavní složky: červenou dřeň – hematopoeticky aktivní dřeň složenou z vyvíjejících se krvinek a jejich progenitorů, a žlutou dřeň – hematopoeticky neaktivní dřeň složenou převážně z adipocytů (tukové buňky) s mezenchymálními buňkami a makrofágy. Během raného dětství obsahují všechny kosti v těle především červenou (aktivní) dřeň. Mezi 5 a 7 lety se adipocyty stanou hojnějšími a začnou zabírat prostory v dlouhých kostech, kterým dříve dominovala červená dřeň. Proces nahrazení aktivní dřeně adipocyty (žlutá dřeň) během vývoje vede k omezení této dřeně u dospělé osoby na hrudní kost, páteř, lopatku, pánev, žebra a proximální část dlouhých kostí. Hematopoeticky neaktivní žlutá dřeň je rozptýlena po červené dřeni, takže u dospělých je v těchto oblastech přibližně stejné množství červené a žluté dřeně. Žlutá dřeň je schopna změnit se zpět v aktivní dřeň v případě zvýšené poptávky po červené kostní dřeni, jako je například nadměrná ztráta krve nebo hemolýza (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016).

1. 1. 2 Vývoj krevních elementů a jejich základní dělení

Hematopoéza neboli krvetvorba je kontinuální, regulovaný proces produkce krevních buněk, který zahrnuje obnovu buněk, proliferaci, diferenciaci a zrání. Tyto procesy vedou ke vzniku, vývoji a specializaci všech funkčních krevních buněk, které jsou uvolňovány z kostní dřeně do krevního oběhu (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016). U lidí začíná hematopoéza ve žloutkovém vaku, poté se přesouvá do fetálních jater a nakonec se přesune do kostní dřeně (definitivní hematopoéza) (Jagannathan-Bogdan a Zon, 2013).

Hematopoézu lze rozdělit do různých fází. První fáze zahrnuje progenitorové kmenové buňky neboli pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC) obsažené v kostní dřeni. Tyto pluripotentní buňky mají dvě primární funkce – udržují zastoupení jednotlivých buněk procesem regenerace a mají schopnost vést ke vzniku všech krevních buněk – erytrocytů, granulocytů, lymfocytů, monocytů a krevních destiček (Gregory S. Travlos, 2006). Nediferencované HSC se mohou rozlišit na linie vázané k lymfoidním nebo myeloidním buňkám. Lymfoidní progenitor proliferuje a diferencuje na T, B, NK-buňky a dendritické linie. Myeloidní progenitor proliferuje a diferencuje na jednotlivé granulocytové, erytrocytové, monocytární a megakaryocytové linie. Výsledné progenitory specifické pro linii vedou k morfologicky rozpoznatelným prekurzorovým buňkám specifickým pro danou linii (viz Obr. 1). Přes omezený počet HSC v kostní dřeni se denně produkuje 6 miliard krvinek na kilogram tělesné hmotnosti. Většina buněk v normální kostní dřeni jsou prekurzory buněk v různých stádiích zrání (Anděl *et al.*, 2001).



Obr. 1: Diagram hematopoézy znázorňující vývoj krevních buněk z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky. Hematopoetické kmenové buňky jsou zaměřeny na jeden ze tří možných dějů: obnovení, diferenciaci nebo apoptózu. Z HSC vzniknou dvě identické dceřiné buňky. Obě dceřiné buňky mohou diferenciovat, opouštět kmenové buňky (symetrické dělení), nebo se jedna dceřiná buňka může vracet do fondu kmenových buněk a druhá může diferenciovat (asymetrické dělení), nebo podstoupit apoptózu (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016).

Hlavní roli při proliferaci a diferenciaci HSC a progenitorových buněk hrají cytokiny nebo růstové faktory, které jsou nezbytné k zabránění předčasné apoptózy. Cytokiny zahrnují interleukiny, faktory stimulující kolonie, chemokiny, interferony a další (Stříž a Holář, 2015). Cytokiny mohou mít pozitivní nebo negativní vliv na HSC a progenitory krevních buněk, některé jsou specifické pro linii a jiné fungují pouze v kombinaci s jinými cytokiny (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016).

Základní dělení leukocytů

Leukocyty (bílé krvinky) se dělí do dvou základních skupin: granulocyty a agranulocyty. Granulocyty jsou skupinou, jejichž cytoplazma je naplněná granulami s různými barvicími charakteristikami a jejichž jádra jsou segmentovaná. Granulocyty zahrnují eosinofily, bazofily a neutrofil. Neutrofil je hlavní složkou vrozené imunity jako fagocyt,

eosinofily se podílejí hlavně při alergických reakcích a antiparazitární imunitě, a bazofily se uplatňují při zánětlivých a alergických procesech. Mezi agranulocyty patří lymfocyty a monocyty. Tyto buňky jsou mononukleární a jejich jádra nejsou segmentovaná. Monocyty jsou prekurzory tkáňových buněk, jako jsou osteoklasty, makrofágy a dendritické buňky. Jako skupina plní několik funkcí jako fagocyty. Většina lymfocytů se podílí na adaptivní imunitě. B-lymfocyty a plazmatické buňky produkují protilátky, T-lymfocyty zprostředkovávají imunitní odpověď proti intracelulárním a extracelulárním antigenům. B i T lymfocyty produkují paměťové buňky pro specifické antigeny, takže imunitní odpověď je v případě setkání se známým antigenem rychlejší (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016).

1. 1. 3 CD klasifikace

CD antigeny (cluster of differentiation) jsou molekuly buněčného povrchu exprimované na leukocytech a dalších buňkách imunitního systému. Určení CD znaků je moderní metoda, která pomáhá rozlišovat povrchové znaky buněk. CD nomenklatura byla univerzálně přijata vědeckou komunitou a je oficiálně schválena Mezinárodní unií imunologických společností a Světovou zdravotnickou organizací. Poskytuje jednotný systém označování pro monoklonální protilátky i pro molekuly buněčného povrchu. Za posledních 30 let bylo vytvořeno formální označení pro více než 400 molekul (Zola *et al.*, 2007). CD molekuly se běžně používají jako buněčné markery, což umožňuje identifikaci a izolaci populací leukocytů a jejich podmnožin s různou fází diferenciací. Rozlišení těchto molekul se ukázalo jako nezbytné pro biomedicínský výzkum a diagnostiku (Engel *et al.*, 2015).

CD číslo je přiřazeno ke skupině monoklonálních protilátek, které rozpoznávají stejnou molekulu buněčného povrchu (např. CD2 nebo CD3). CD nomenklatura se také používá k pojmenování samotné molekuly. Například CD4 označuje jak skupinu monoklonálních protilátek rozpoznávající molekulu buněčného povrchu CD4, tak i samotnou molekulu CD4. Velká písmena za číslem CD označují variantu extracelulární domény buněčné povrchové molekuly. Například CD45RA nebo CD45RO odpovídá variantám CD45 (leukocytární antigen). Malé písmeno za číslem CD (např. CD1a, CD1b, CD1c, CD1d nebo CD1e) označuje několik molekul, které sdílejí společný řetězec, v tomto příkladu β 2-mikroglobulin (Kumar, Lu a Schwartz-albiez, 2012).

Některé CD znaky jsou sdílené napříč populacemi buněk, některé jsou typické pro určitou subpopulaci buněk. CD antigeny nesou kromě leukocytů například i krevní destičky nebo červené krvinky. Každá leukocytární populace má typické znaky např. pro leukocyty

pan-specifický CD45, pro T-lymfocyty CD3, CD4, CD8, pro B-lymfocyty CD19 a pro NK-buňky CD161 (Beare *et al.*, 2008).

1.2 Invariantní NK T-lymfocyty

Invariantní NKT buňky (iNKT) neboli invariantní NK T-lymfocyty jsou velmi malou subpopulací lymfocytů. Mají sdílené vlastnosti s NK buňkami a s T-lymfocyty jako je exprese CD3 (T-lymfocyty), CD161 (NK buňky) či NKG2D molekuly (T i NK buňky) (Nguyen, Vanichsarn a Nadeau, 2008; Kuylenstierna *et al.*, 2011). Na rozdíl od T buněk, které rozpoznávají peptidy vázané na vysoce polymorfní hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy I a II, iNKT buňky rozpoznávají lipidové antigeny, jako jsou glykolipidy, prezentované CD1d (nepolymorfní neklasická molekula MHC I třídy). iNKT rozpoznávají hlavně lipidy mikrobů, tumorů, alergenů a vlastní antigeny. Dále také rozpoznávají glykolipid odvozený od mořské houby zvaný α -galactosylceramid (Cianferoni, 2013).

U lidí se hladiny iNKT buněk v periferní krvi mezi jednotlivci velmi liší. Zastoupení iNKT se pohybuje od 0,01 – 1 % T buněk (vlastní nepublikovaná data Hematologicko-onkologického oddělení, FN Plzeň). Studie naznačují, že rozdíly v zastoupení jsou založené také na pohlaví. U žen jsou pozorovány vyšší hladiny iNKT, pravděpodobně kvůli účinkům pohlavních hormonů (Cianferoni, 2013).

Invariantní NK T-lymfocyty jsou vzácná populace s významným účinkem. Mají velmi důležitou úlohu v regulaci imunitní odpovědi přemostěním složek vrozeného a adaptivního imunitního systému (McCarthy *et al.*, 2007).

Invariantní NK T-lymfocyty mohou vyvolat specifické reakce na antigen s produkcí cytokinů. Také dokáží vyvolat cytotoxickou aktivitu, nicméně jejich TCR se vyvinul tak, aby konzervativně rozpoznával různé glykolipidové antigeny a prováděl vrozené, nikoli adaptivní funkce (Bendelac, Savage a Teyton, 2007; Cianferoni, 2013). Navíc bylo prokázáno, že iNKT buňky regulují rozvoj autoimunitních, antimikrobiálních, antitumorálních a antitransplantačních imunitních odpovědí (Meyer *et al.*, 2006).

Nejznámější a více studované NKT buňky jsou NKT buňky typu I, neboli invariantní NKT buňky, které mají uniformní iTCR receptor. Naproti tomu NKT buňky typu II jsou velmi podobné konvenčním T-lymfocytům (Bendelac, Savage a Teyton, 2007; Adams a Luoma, 2012).

1. 2. 1 Vývoj a rozdělení iNKT buněk

Po antigenní stimulaci buňky invariantní NKT buňky rychle reagují produkcí cytokinů. Mohou být také silně cytotoxické a přímo zprostředkovávat buněčnou lýzu pomocí perforinu a granzymu. Tuto funkční heterogenitu lze částečně vysvětlit objevem buněčných podskupin iNKT, které produkují různé cytokiny a jsou přítomné v různých tkáních (Gapin, 2017).

Bylo zjištěno, že iNKT buňky jsou heterogenní populací, u které existují tři hlavní funkční podskupiny, dělicí se podle jejich exprese transkripčních faktorů specifických pro linii a podle potenciálu schopnosti produkovat cytokiny. Tyto tři podskupiny iNKT buněk jsou označeny jako NKT1, NKT2 a NKT17, analogicky s klasickými pomocnými liniemi CD4+ T-lymfocytů. Podmnožiny produkují odlišné cytokiny a sídlí v odlišných tkáních (Peralbo *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2015; Bennstein, 2018).

Selekce, specifikace a efektorová diferenciaci iNKT buněk probíhá v brzlíku. Původně byly dvojitě negativní (DN) iNKT buňky asociovány hlavně s Th1 – cytotoxickým fenotypem, zatímco u CD4+ iNKT buněk byly produkovány cytokiny typu Th1 i Th2. Nakonec se ukázalo, že iNKT diferencují do stejných skupin jako Th lymfocyty. Efektorová diferenciaci na NKT1, NKT2 a NKT17 je ovlivňována a řízena různými faktory. Například cytokinové signály hrají zásadní roli při diferenciaci. Po opuštění brzlíku jsou iNKT buňky zralé efektorové buňky, což ukazuje, že jejich terminální diferenciaci nastává již během vývoje (Shissler a Webb, 2019).

Podobně jako diferenciaci podskupin CD4+ T-lymfocytů (Th1, Th2 a Th17) také iNKT diferenciaci je silně ovlivněna různými cytokinovými signály. Ukázalo se například, že buňky NKT1 vysoce exprimují CD122 a současně signalizace IL-15 zprostředkovaná CD122 je nezbytná pro diferenciaci buněk NKT1. Podobně nepřítomnost signalizace TGF- β vedla k úplné ztrátě NKT17 buněk. NKT2 a NKT17 buňky exprimují receptor IL-25, který je nezbytný pro produkci IL-13, IL-9, IL-10 a IL-17 po stimulaci α -GalCer, což prokazuje, že produkce cytokinů aktivovaných iNKT buněk je ovlivňována signálem přes tento receptor (Wang a Hogquist, 2018).

1. 2. 2 Klíčové molekuly pro aktivaci iNKT buněk

Mezi stěžejní molekuly důležité pro aktivaci iNKT buněk patří invariantní NKT buněčný receptor, což je hlavní receptor iNKT buněk, pomocí kterého buňky poznávají lipidové antigeny prezentované CD1d molekulou. Dále sem patří další široké spektrum

receptorů důležitých pro co-stimulaci jako CD28, ICOS (Zheng *et al.*, 2008), check-point molekuly (Chang *et al.*, 2008) z nichž nejdůležitější v rámci našich experimentů je aktivační receptor NKG2D a membránový glykoprotein CD62L neboli L-selektin (Cianferoni, 2013).

1. 2. 2. 1 Invariantní NKT buněčný receptor (iTCR)

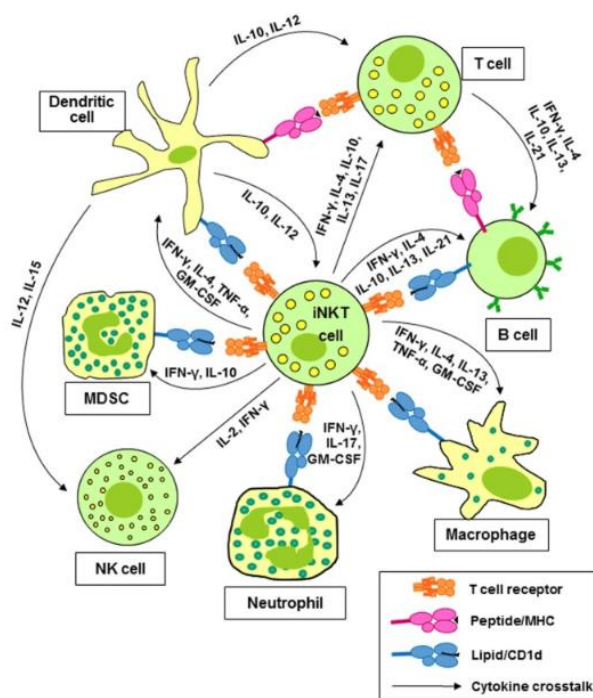
Prostřednictvím invariantního T buněčného receptoru rozpoznávají iNKT buňky bakteriální a endogenní glykolipidové antigeny prezentované CD1d molekulou a rychle produkují velké množství cytokinů (Meyer *et al.*, 2006). Invariantní NKT buňky mají T buněčný receptor, který se skládá z α a β řetězců. Každý řetězec je rozdělen na variabilní (V) a konstantní (C) domény. Variabilní domény α řetězce jsou kódovány V a J (joining) genovými segmenty, zatímco u β řetězce jsou kódovány V, J a D (diversity) segmenty. Konkrétně se iTCR skládá z V α 24-J α 18/V β 11 řetězců (van Schaik *et al.*, 2008). Studie ukázaly, že V α 24-V β 11 NKT TCR je relativně rigidní, pokud je vázán na α -GalCer-CD1d. Taková interakce je téměř totožná s interakcí mezi myším typem I V α 14-V β 8.2 NKT TCR a α -GalCer-CD1d. Tyto charakteristiky ukazují, že invariantní NKT je vrozený receptor. Je to tedy zárodečně kódovaný receptor interagující s jeho ligandy konzervativně (Pellicci *et al.*, 2015).

1. 2. 2. 2 CD1d molekula

Invariantní NKT buňky rozpoznávají lipidové antigeny prezentované pomocí CD1d molekuly, což je polymorfní neklasická MHC molekula I. třídy. Molekuly CD1 jsou povrchové glykoproteiny spojené s β 2-mikroglobulinem, které mají významnou strukturální podobnost s molekulami MHC I. třídy (Moody, Zajonc a Wilson, 2005). Skupina CD1 je exprimována na antigen prezentujících buňkách (APC) a prezentuje lipidy a glykolipidy např. T buňkám (Porcelli *et al.*, 1998). U lidí se rozlišují CD1a, CD1b, CD1c, CD1d a CD1e. Geny kódující molekuly CD1 (CD1a, -b, -c, -d a -e) jsou u lidí přítomny na prvním chromozomu. Na základě podobnosti exprese a funkce jsou CD1a, -b, -c a -e klasifikovány jako skupina 1 CD1 molekul (Bendelac, Savage a Teyton, 2007).

Molekula CD1d tvoří samostatnou skupinu 2 CD1. Molekula CD1d byla identifikována u myši a lidí jako molekula, která je důležitá pro vývoj a funkci iNKT buněk (Porcelli, 1995). Tato molekula je schopna vázat jak endogenní přirozené lipidové antigeny, tak mikrobiální antigeny či syntetické molekuly (Brutkiewicz, 2006).

Na obrázku 2 jsou znázorněny interakce mezi antigen prezentujícími buňkami (dendritické buňky, makrofágy, NK buňky, T buňky a jiné) a invariantními NKT buňkami pomocí interakcí molekuly CD1d vázající lipid a T buněčného receptoru. Tyto interakce a následná produkce cytokinů vede k aktivaci a regulaci těchto buněk (Doherty *et al.*, 2018).



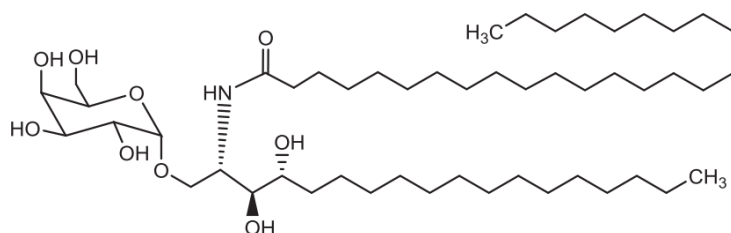
Obr. 2: Interakce antigen prezentujících buněk s iNKT buňkami pomocí CD1d molekuly vázající lipid a T receptoru (Doherty *et al.*, 2018).

Expresí CD1d se dá zvýšit pomocí kyseliny all-trans retinové (ATRA) (Rotolo *et al.*, 2018). Tato upregulace zvyšuje pravděpodobnost interakce CD1d pozitivních buněk a iNKT buněk. Kyselina all-trans retinová je velmi aktivní metabolit vitamínu A, který je jen velmi málo toxický, takže ho lze používat jako stimulant nejen *in vitro*, ale také *in vivo* (Chen a Ross, 2015).

Sloučenina α -galactosylceramid

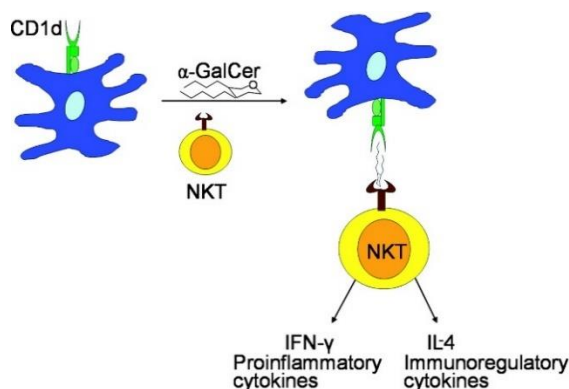
CD1 proteiny váží vlastní nebo cizí glykolipid za účelem prezentace T buňkám. Bylo syntetizováno a testováno několik glykolipidů za účelem určení jejich schopnosti aktivovat myši a lidské NKT buňky. Testy zahrnovaly analogy α -galactosylceramidu (α -GalCer), bakteriální glykolipidy a různé vlastní glykolipidy. Glykolipid α -GalCer (obecný název KRN7000), který byl izolován z výtažku mořské houby *Agelas mauritanus*, je sloučenina, která se nevyskytuje v buňkách savců a dokáže aktivovat iNKT buňky. Na obrázku 3 je

znázorněna struktura α -GalCer sestávající z galaktózy kombinované s ceramidem v α -konfiguraci (Wu *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2016).



Obr. 3: Chemická struktura α -galactosylceramidu (Woods *et al.*, 2016).

Na obrázku 4 je znázorněno, jak jsou NKT buňky reaktivní k CD1d vázanému α -GalCer. Tato stimulace vede k produkci velkého množství cytokinů, jako je IL-4 a IFN γ (Wu *et al.*, 2005).



Obr. 4: Reaktivita NKT buněk k CD1d vázající α -GalCer (Wu *et al.*, 2005).

1. 2. 2. 3 Receptor NKG2D

Reakce NK a T buněk na patogeny a nádory je regulována integrací signálů z četných receptorů exprimovaných na jejich buněčném povrchu, které mohou zvyšovat nebo potlačovat jejich efektorové funkce. Zatímco rozpoznávání a aktivaci T-buněk dominují antigenně specifické receptory T-buněk, NK buňky používají rozsáhlý repertoár receptorů kódovaných zárodečnými liniemi, z nichž mnohé jsou také exprimovány T buňkami. Jedním z nejlépe charakterizovaných receptorů sdílených NK buňkami, T buňkami a invariantními NKT buňkami je aktivační receptor NKG2D. Obecně zdravé dospělé tkáně neexprimují NKG2D glykoproteiny na buněčném povrchu, ale exprese tohoto ligandu může být indukována hyperproliferací a transformací, stejně jako když jsou buňky infikovány patogeny. Dráha NKG2D slouží k detekci a eliminaci buněk, které prošly „stresem“. Viry a nádorové buňky si vyvinuly četné strategie, jak se vyhnout detekci systémem NKG2D. NKG2D poskytuje

atraktivní cíl pro léčiva při léčbě infekčních onemocnění, rakoviny a autoimunitních onemocnění (Lewis L. Lanier, 2017). NKG2D dokáže přímo spouštět aktivitu NK buněk a výrazně potencovat aktivitu iNKT buněk (Kuylenstierna *et al.*, 2011).

1. 2. 2. 4 L-selektin (CD62L)

Selektiny jsou membránové glykoproteiny a důležité adhezivní molekuly v časném období imunitní odpovědi. Skupina selektinů se skládá ze tří úzce homologních glykoproteinů: E-selektinu (na povrchu endoteliálních buněk), P-selektinu (na povrchu endoteliálních buněk a krevních destiček) a L-selektinu, který je exprimován na většině leukocytů. L-selektin označovaný jako CD62L vykazuje adhezivní i signální funkce a je zvláště důležitý pro migraci lymfocytů na sekundární lymfoidní orgány. L-selektin hraje důležitou roli v akutní i chronické zánětlivé reakci (Ye *et al.*, 2017).

Podle studie od Tian *et al.* (2016) expanze NKT buněk *ex vivo* a jejich následná *in vivo* perzistence závisí na subpopulaci CD62L pozitivních NKT buňkách. Pouze CD62L pozitivní NKT přežívají a proliferují v reakci na opakovanou stimulaci TCR, zatímco buňky CD62L negativní podléhají časnému vyčerpání a buněčné smrti. (Tian *et al.*, 2016).

1. 2. 3 Funkce iNKT buněk

Invariantní NKT buňky mají širokou škálu funkcí. Regulují imunitní odpověď, produkují cytokiny a mají cytotoxický efekt na cílové buňky.

1. 2. 3. 1 Produkce cytokinů

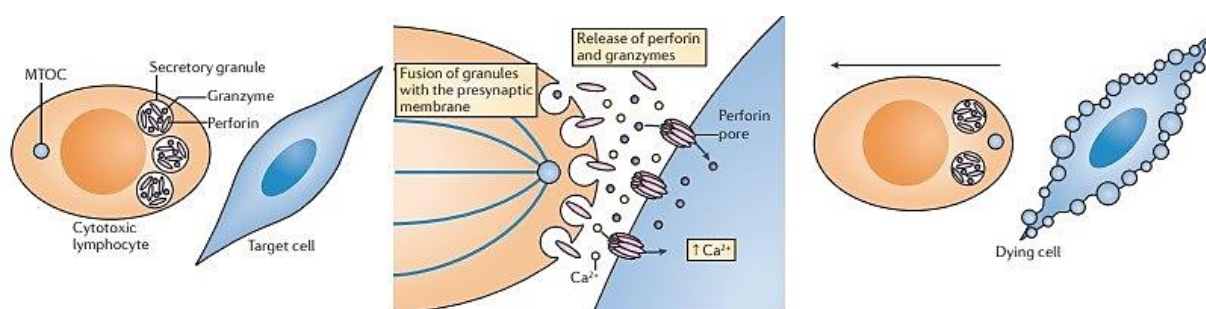
Pomocí iTCR rozpoznávají iNKT buňky bakteriální a endogenní glykolipidové antigeny prezentované CD1d molekulou a mohou tak produkovat velké množství cytokinů, včetně IL-4 a IFN γ . Tyto cytokiny zlepšují funkci dendritických buněk, NK buněk, B buněk, a stejně tak i CD4+ a CD8+ T buněk. Rychlá produkce cytokinů iNKT buňkami jim dává schopnost amplifikovat a regulovat adaptivní imunitní odpovědi, a tak spojovat vrozenou a adaptivní imunitu. Po aktivaci jsou schopny produkovat širokou škálu cytokinů jako IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, RANTES, MIP-1 α nebo β a ovlivňují rozvoj Th1 a Th2 odpovědi (Juno, Keynan a Fowke, 2012).

iNKT buňky při vhodné stimulaci podporují Th2 odpověď, produkci IgE a následnou senzibilizaci, což naznačují následující data. Současné podávání exogenního proteinového antigenu s α -GalCer vede ke zvýšení citlivosti myších buněk s Th2 odpovědí k tomuto

antigenů. Podobně, aktivace iNKT buněk *in vivo* s α -GalCer nebo jiným glykolipidovým antigenem vede k rychlému zvýšení IgE v séru (Kim *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006).

1. 2. 3. 2 Přímá cytotoxická aktivita

Podobně jako NK buňky, iNKT buňky exprimují cytotoxická granula obsahující perforin a granzym. Tyto cytotoxické látky jsou schopny usmrcovat cílové buňky, jako jsou aktivované, infikované a maligní buňky (viz Obr. 5). Kromě toho cytotoxicita iNKT buněk zvyšuje míru lokálního zánětu, podílí se na protinádorové obraně a může podporovat imunitní odchylky usmrcením T-reg buněk (McCarthy *et al.*, 2007; Nguyen, Vanichsarn a Nadeau, 2008).



Obr. 5: Interakce cytotoxického lymfocytu s cílovou buňkou pomocí granzymu a perforinu. Na obrázku jsou znázorněny interakce cytotoxického lymfocytu s cílovou buňkou. Cytotoxický lymfocyt rozpoznává svou cílovou buňku a centrum organizující mikrotubuly (MTOC) cytotoxických lymfocytů polarizuje a vylučuje granula směrem k presynaptické membráně. Sekreční granula pak fúzí s presynaptickou membránou a uvolňují perforin a granzym do synaptické štěrby. V postsynaptické membráně tvoří perforin velké transmembránové póry, které umožňují difúzi granzymů do cytosolu cílové buňky. Granzymy pak iniciují apoptózu cílové buňky a cytotoxické lymfocyty se uvolňují z umírající buňky (označeno šipkou) a mohou interagovat s jinou cílovou buňkou (Voskoboinik, Whisstock a Trapani, 2015).

U některých infekcí, jako je leishmanióza, může být pro boj s infekcí nezbytná cytotoxicita iNKT buněk. Dendritické buňky infikované *Leishmania infantum* zvyšují expresi CD1d na svém povrchu, a proto je lze iNKT buňkami účinně rozeznat a zabít. Taková cytotoxicita je zvýšena IL-4, který je produkován autokrinním způsobem (Kaneko *et al.*, 2000; Campos-Martín *et al.*, 2006).

1. 2. 4 Role iNKT buněk v patofyziologických procesech

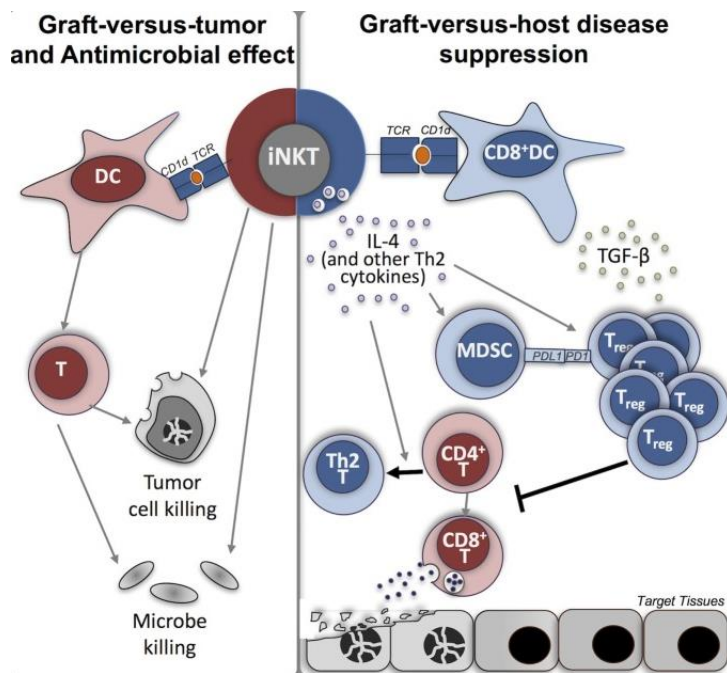
Invariantní NKT buňky hrají významnou roli při regulaci imunitní odpovědi, a to jak při fyziologických procesech, tak při různých patologických stavech.

1. 2. 4. 1 Význam iNKT buněk při regulaci imunity

Invariantní NKT buňky jsou důležité při regulaci imunity díky svým imunomodulačním a cytotoxickým vlastnostem. Tyto funkce iNKT buňky využívají při transplantaci hematopoetických krvetvorných buněk, při které může dojít k relapsu nebo k reakci štěpu proti hostiteli (GvHD reakce), při které T buňky ve štěpu působí proti buňkám příjemce. Regulace imunity pomocí iNKT buněk se uplatňuje také u alergií a autoimunitních onemocněních.

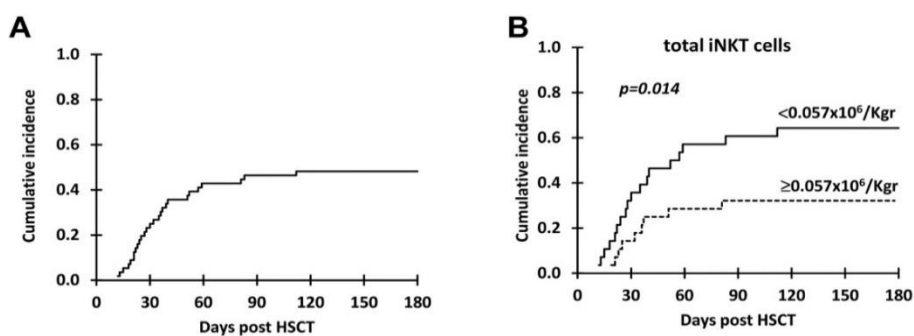
1. 2. 4. 1. 1 iNKT a reakce štěpu proti hostiteli

Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD – z angl. Graft versus host disease) je závažná komplikace, ke které často dochází po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Při této reakci T-buňky přítomné v dárcovském štěpu rozpoznávají tkáňové antigeny příjemce jako cizorodé a reagují proti nim. Nedávné studie zdůrazňují klíčovou roli iNKT buněk v regulaci GvHD. Ukázaly, že vyšší frekvence iNKT buněk u pacientů korelovala s nižším rizikem GvHD (Rubio *et al.*, 2012). U studií na myších stimulace pomocí α -GalCer nebo adoptivní přenos iNKT buněk poskytují podstatnou ochranu proti GvHD. Dále bylo prokázáno, že pro optimální potlačení GvHD je rozhodující IL-4 produkovaný iNKT buňkami a následná expanze regulačních T buněk (Schneidawind *et al.*, 2014). Tato data ukazují, že iNKT buňky mohou být vhodným terapeutickým režimem pro pacienty s GvHD (Mavers, Maas-Bauer a Negrin, 2017; Wang a Hogquist, 2018).



Obr. 6: Role invariantních NKT buněk při alogenní transplantaci kmenových buněk (Mavers, Maas-Bauer a Negrin, 2017). Na obrázku jsou znázorněny různé role iNKT buněk při transplantaci alogenních kmenových buněk, mezi které patří účinek štěpu proti nádoru, antimikrobiální účinek a potlačení reakce štěpu proti hostiteli. Jsou zde znázorněny předpokládané mechanismy, kterými může iNKT fungovat pro potlačení GvHD. Červená barva představuje zánětlivý fenotyp, modrá barva představuje supresivní nebo protizánětlivý fenotyp, oranžový kruh představuje endogenní lipidový antigen, cizí lipidový antigen nebo exogenní syntetický lipidový antigen (tj. α -GalCer). iNKT buňky působí na ostatní efektorové buňky např. produkcí IL-4 a jejich přímou aktivací (Mavers, Maas-Bauer a Negrin, 2017).

Bylo také prokázáno, že aplikovaná dávka iNKT ovlivňuje pravděpodobnost vzniku GvHD (viz Obr. 7) (Chaidos *et al.*, 2012).



Obr. 7: Grafy znázorňující výskyt reakce štěpu proti hostiteli. A - všichni pacienti, B – pacienti, kteří dostávali vyšší nebo střední dávku iNKT buněk (Chaidos *et al.*, 2012).

V rámci zvířecích studií bylo podle Du *et al.*, 2017 sledováno, že nízké dávky infuze iNKT buněk účinně bránily a byly schopné zvrátit chronickou reakci štetu proti hostiteli (cGvHD) a zároveň *in vivo* stimulace iNKT buněk α -GalCer byla účinná, jak v prevenci, tak v léčbě cGvHD. Díky klíčové roli iNKT buněk při regulaci patogeneze cGvHD se mohou iNKT buňky stát potenciálně novou profylaktickou a terapeutickou možností pro pacienty s GvHD (Du *et al.*, 2017).

1. 2. 4. 1. 2 iNKT a alergie

iNKT buňky produkují nejen cytokiny, které ovlivňují adaptivní imunitu, ale také fungují jako kritické efektorové buňky, které mohou indukovat rozvoj hyperreakivity dýchacích cest (AHR). NKT buňky reagující na glykolipidové antigeny, stejně jako běžné CD4⁺ T buňky reagující na peptidové antigeny, mohou být synergické při indukcii AHR, i když v některých případech může každý nezávisle indukovat AHR (Meyer *et al.*, 2006).

Astma je zánětlivé plicní onemocnění, u kterého CD4⁺ T buňky produkující IL-4 a IL-13 hrají patogenní roli. Polarizace iNKT buněk na Th2 odpověď hraje klíčovou roli ve vývoji astmatu. Experimenty ukazují, že produkce IL-4 a IL-13 iNKT buňkami je zásadní při rozvoji hyperreakivity dýchacích cest a těžkého perzistujícího astmatu. Respirační podání glykolipidových antigenů (např. α -galaktosylceramid), které specificky aktivují NKT buňky, rychle vyvolá AHR (Kim *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006). Dále se na pokusu u myši s deficitem NKT buněk ukázalo, že alergenem indukovaná hyperreaktivita dýchacích cest se nevyvíjí v nepřítomnosti myšního V α 14 řetězce T buněčného receptoru NKT buněk (Akbari *et al.*, 2003).

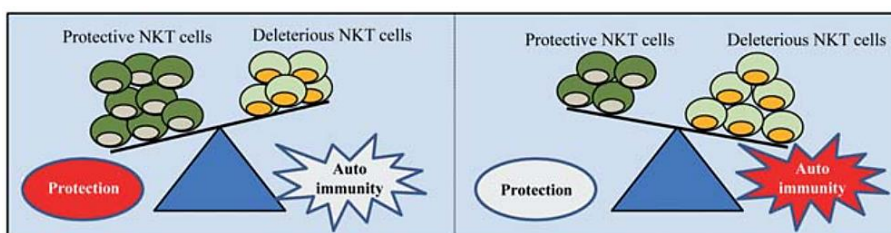
1. 2. 4. 1. 3 iNKT a autoimunitní onemocnění

Autoimunita se rozvíjí, když je snížena tolerance vůči vlastním tkáním. Tradiční léčba autoimunitních onemocnění se převážně opírala o imunosupresivní a protizánětlivá činidla, která často poskytují pouze krátkodobou úlevu. Lepším přístupem imunoterapie by měla být prevence klinických projevů, nebo zastavení progresu onemocnění. Tolerance vůči autoantigenům je regulována několika typy buněk s imunoregulačními vlastnostmi, jako jsou CD1d-regulované iNKT buňky nebo T regulační buňky (Van Kaer a Wu, 2018).

Invariantní NKT buňky hrají roli jak v ochraně, tak v patogenezi autoimunitních onemocněních. Zdá se, že iNKT buňky podporují aterosklerózu, zatímco u některých modelů diabetu typu I, lupusu a rakoviny mají supresivní roli (Tupin *et al.*, 2004).

Funkčně defektní skupina NKT buněk byla popsána u několika autoimunitních onemocnění jako je roztroušená skleróza, systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, diabetes typu 1 nebo Crohnova choroba. Podle Simoni *et al.*, 2003 pacienti s diabetem typu I, včetně identických dvojčat, měli méně iNKT buněk, které produkovaly méně Th2 cytokinů než jejich nediabetičtí sourozenci (Simoni *et al.*, 2013).

Studie na pacientech a zvířecích modelech s autoimunitními onemocněními popisují různé role podskupin iNKT buněk. Například CD4+ iNKT buňky brání diabetu typu 1 u myší i lidí (Magalhaes, Kiaf a Lehuen, 2015), zatímco iNKT17 buňky zvyšují výskyt onemocnění. U pacientů s roztroušenou sklerózou v remisi CD4+ iNKT buňky vylučují velké množství IL-4, což svědčí o jejich prospěšné roli. Oproti tomu CD4+ iNKT buňky infiltrují léze při psoriáze (lupénka) a u aterosklerózy mohou být také patogenní. Všechna tato data naznačují, že ochrana nebo opětovné vzplanutí autoimunitních nemocí způsobené iNKT buňkami může být zapříčiněna nerovnováhou mezi různými podskupinami. Tato hypotéza je znázorněna na obrázku 8 (Simoni *et al.*, 2013).



Obr. 8: Hypotéza týkající se účinku různých podmnožin iNKT buněk v autoimunitě (Simoni *et al.*, 2013).

1. 2. 4. 2 Význam iNKT buněk u nádorů

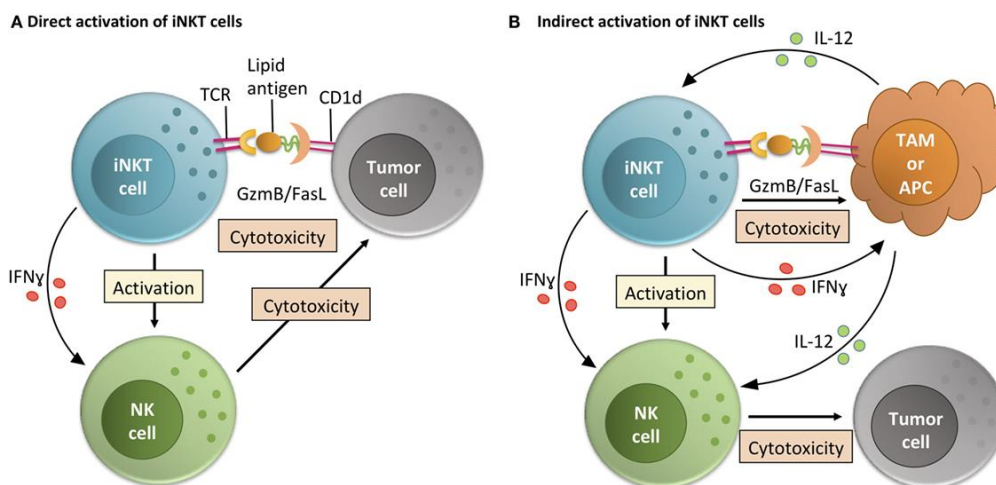
Invariantní NKT buňky mohou zprostředkovat protinádorovou imunitu přímým rozpoznáváním nádorových buněk, které exprimují CD1d, anebo prostřednictvím rozpoznávání CD1d nalezeného na buňkách v mikroprostředí nádoru (Wolf, Choi a Exley, 2018).

Invariantní NKT buňky byly objeveny v době, kdy byl α -GalCer studován v souvislosti s protinádorovou terapií. Od té doby se hromadí důkazy, že iNKT buňky hrají důležitou roli v protinádorové imunitě. Dvojitě negativní iNKT buňky a $\text{IFN}\gamma$ produkovaný iNKT buňkami jsou s největší pravděpodobností odpovědné za tuto protinádorovou aktivitu aktivací NK buněk. Zatím však není jasné, zda iNKT buňky mohou přímo cílit na nádor nebo blokovat angiogenezi řízenou makrofágy asociovanými s CD1d. U lidí je hladina iNKT buněk

snížena v nádorech, jako jsou karcinomy plic, prsu, tlustého střeva a v melanomu. Pacienti s vyššími hladinami iNKT buněk mají lepší prognózu (Song *et al.*, 2009; Cianferoni, 2013). *In vivo* aktivace iNKT buněk se používá v mnohých klinických studiích, které sledují vliv *ex vivo* aktivovaných a pulsovaných dendritických buněk pomocí α -GalCer na zastoupení a cytotoxický potenciál iNKT buněk (Nencioni *et al.*, 2008; Palucka a Banchereau, 2013). Tyto studie potvrzují zvýšené zastoupení iNKT buněk, zvýšení protinádorové imunity a zpomalení nádorového růstu (Motohashi *et al.*, 2006; Nagato *et al.*, 2012).

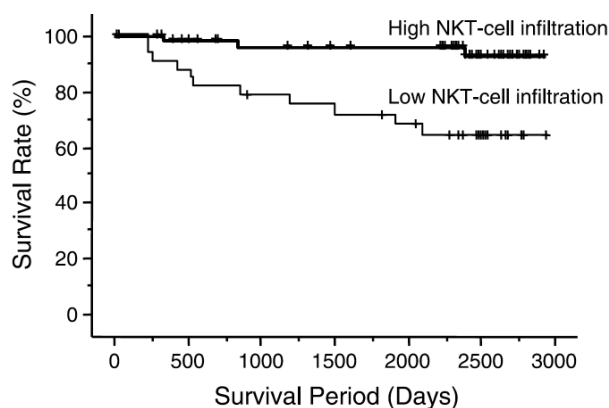
iNKT podporují reakci štěpu proti nádoru neboli GVT efekt. Metabolismus u nádorových buněk je odlišný. Na jejich povrchu jsou prezentovány tumorsociované antigeny, což jsou lipidy, které mohou přemostit CD1d a invariantní buněčný TCR (Mavers, Maas-Bauer a Negrin, 2017).

iNKT buňky mohou fungovat v mikroprostředí nádoru (TME) prostřednictvím přímých nebo nepřímých interakcí s nádorovými buňkami. Tyto interakce jsou znázorněny na obrázku 9 (Wolf, Choi a Exley, 2018).



Obr. 9: Aktivita iNKT buněk v mikroprostředí nádoru. V přímé aktivační cestě (A) rozpoznávají iNKT buňky lipid-CD1d komplexy na povrchu nádorových buněk a poté přímo zprostředkovávají zabíjení nádorových buněk. Vytvořením zánětlivých cytokinů, jako je $\text{IFN}\gamma$, pomáhají NK buňkám v TME vykonávat jejich protinádorové efektorové funkce. V nepřímé aktivační cestě (B) iNKT buňky rozpoznávají lipid-CD1d komplexy na povrchu antigen prezentujících buněk (APC) nebo makrofágů spojených s tkáněmi (TAM). Tato interakce vede k zabíjení imunosupresivních makrofágů TAM zprostředkovaných iNKT buňkami, což vede k méně imunosupresivnímu prostředí, kde NK buňky infiltrující nádor mohou lépe plnit své funkce (Wolf, Choi a Exley, 2018).

Hladina iNKT buněk koreluje s počtem přežití u mnoha typů rakoviny (karcinomy, melanomy, myelomy), což je znázorněno v grafu na obrázku 10. Při nízké hladině iNKT buněk je výrazně nižší procento přežití (Tachibana *et al.*, 2005).



Obr. 10: Analýza celkového přežití pacientů s kolorektálním karcinomem v závislosti na stupni infiltrace iNKT buňkami (Tachibana *et al.*, 2005).

1. 2. 4. 3 Význam iNKT buněk u infekčních onemocnění

Bylo prokázáno, že iNKT buňky hrají roli v obraně proti bakteriálním, virovým, houbovým a protozoálním infekcím. Zdají se být důležité u myši v boji proti *Streptococcus pneumonia*, která je indukuje k vylučování $IFN\gamma$ a IL-17. *Chlamydia trachomatis* a *C. muridarum* mají antigen, který je schopen aktivovat iNKT buňky. Mechanismus takového zapojení však dosud nebyl objasněn. iNKT buňky v myším modelu byly také důležité při infekci *Borrelia burgdorferi* (Bendelac, Savage a Teyton, 2007; Cianferoni, 2013).

Invariantní NK T-lymfocyty jsou důležité při plísňových infekcích, jako je například infekce plic způsobná *Cryptococcus neoformans*. U myši jsou Th1 cytokiny z iNKT buněk nezbytné pro boj s *C. neoformans*. Na základě zvířecích modelů se iNKT buňky zdají být důležité také pro imunitní odpověď proti některým parazitům, jako je *Leishmania major*, *L. donovani* a *Trypanosoma cruzi*. iNKT buňky jsou také důležité u myšního modelu v boji proti virovým infekcím, zejména herpesvirům, jako je infekce cytomegalovirem nebo herpes simplex virem. U lidí je nedostatek iNKT buněk primárně spojen s rozsáhlými virovými infekcemi (Duthie *et al.*, 2002; Ashkar a Rosenthal, 2003; Chang *et al.*, 2011; Cianferoni, 2013).

2 Cíle práce a hypotéza

Cílem této práce bylo:

- izolovat invariantní NKT buňky pomocí magnetické separace a zajistit jejich expanzi
- stanovit imunomodulační vlastnosti iNKT
- stanovit cytotoxický potenciál iNKT
- stanovit imunofenotyp iNKT
- detekovat rozdíly v chování invariantních NKT buněk mezi jednotlivými zdravými jedinci

Pracovní hypotéza: Invariantní NK T-lymfocyty jsou variabilní populace, která má různý imunofenotyp, cytotoxický a imunomodulační potenciál.

3 Materiál a metody

3.1 Seznam použitého materiálu a reagensů

Materiál

- běžný materiál: centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml, nastavitelné pipety a jednorázové špičky s filtrem, Eppendorf zkumavky, sérologické pipety, Pasteurovy pipety, stříkačky, jehly
- kryozkumavky 1,8 ml (NUNC, ThermoFisher Scientific, USA)
- magnetické kolony a magnetický stojan (LS columns a MidiMACS separator, Miltenyi Biotech, Německo)
- Bürkerova komůrka
- kultivační destička s U dnem s 96 jamkami a 24 jamkami (Corning, USA)
- kultivační zkumavky o objemu 15 ml (TPP, Švýcarsko)
- zkumavky 12x75mm (BD, USA)

Reagencie

- albumin (albumorm 20%, Octapharma, Švýcarsko)
- Gibco® Antibiotic-Antimycotic (10,000 units/ml penicilinu, 10,000 µg/ml streptomycinu a 25 µg/ml Amphotericin B)
- dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wak-Chemie, Německo)
- fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, USA)
- Ficoll-Paque-premium (GE Healthcare, USA)
- HEPES (1M; Gibco, USA)
- IL-15 (naředěno na 150IU/µl) (Miltenyi Biotech, Německo)
- IMDM médium (Gibco, USA)
- L-Glutamin (200MM; Gibco, USA)
- magnetické mikročástice s protilátkou (iNKT isolation kit, Miltenyi, Německo)
- PBS (Gibco, USA)
- pyruvát sodný (100mM; Gibco, USA)
- RPMI médium (Gibco, USA)
- CFSE próba (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, Life Technologies, USA)
- alpha-Galactosylceramide (α -GalCer, KRN7000) (Cyaman Chemical, USA)
- protilátky: CD45 – BrilliantViolet 510 CD45RO – BV510 (obě Biolegend, USA), CD3 – FITC, CD4 – APC-Cy7, CD8 – FITC (vše Exbio, Česká

republika), TCRV β 11 – APC (Beckman Coulter, USA), TCR V α 24-J α 18 (klon 6B11) – PE a BV421 (obě Biolegend), NKG2D (CD314) – PE, CD25 – APC, CD45RA – PerCP Cy5-5, 7-actinomycin (7-AAD) (vše Exbio)

- nádorové buněčné linie: RAJI (Burkittův lymfom), H929 (mnohočetný myelom), KG1a (akutní myeloidní leukémie) a K562 (chronická myeloidní leukémie) vše zakoupeno ze Sigma Aldrich

Složení médií a roztoků

- iNKT médium: 1 % ATB, 1 % pyruvát sodný, 1,5 % HEPES, 2 % L-Glutamin, 10 % FBS, 0,1 % merkptoethanol do RPMI
- rozmrazovací médium: 20 % FBS + 1 % ATB do RPMI
- promývací médium: 10 % albumorm + 1 % ATB do RPMI
- rozvolňovací roztok (zamrazování): 60 % albumorm + 40 % PBS
- kryomédium pro mononukleární buňky a nádorové linie: 80 % FBS + 20 % DMSO
- kryomédium pro iNKT buňky: 40 % PBS, 40 % albumorm a 20 % DMSO

Kultivační média pro nádorové buněčné linie

- RAJI a K562: 10 % FBS + 1 % ml ATB do RPMI
- H929: 10 % FBS + 1 % ATB + 1 % L-Glutamin + 0,1 % merkptoethanol do RPMI
- KG1a: 10 % FBS + 1 % ATB do IMDM

Přístroje a příslušenství

- PCR box s hepa-filtrem (ESCO, Německo)
- průtokový cytometr ARIA Fusion (BD Bioscience, USA)
- CO₂ inkubátor (Thermo, USA)
- řízený zmrazovač (IceCube, SY-LAB, Rakousko)
- malé přístroje – centrifugy, vortex, sptripetor, mikroskop
- ozařovač Gammacell 1000 Elite (Best Theratronics, Kanada)

3.2 Obecné schéma práce s invariantními NK T-buňkami

Invariantní NKT buňky byly izolovány z mononukleárních buněk (MNC) zdravých dárců. Poté byly kultivovány za příslušných podmínek a po dosažení dostatečné koncentrace a čistoty byly zamrazeny a připraveny pro další testování. Po rozmrazení byly 24 hodin rekultivovány a následně použity na cytotoxické a imunomodulační testy a na určení imunofenotypu. Práce byla po celou dobu prováděna ve sterilním prostředí v PCR boxu, aby nedošlo ke kontaminaci buněk, s výjimkou práce s protilátkami pro průtokovou cytometrii.

3.3 Izolace mononukleárních buněk

Pro izolaci mononukleárních buněk byly použity buňky zdravých dárců, kteří podepsali informovaný souhlas schválený etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni dne 7. 6. 2018.

K 9 ml plné krve, která byla přenesena do 50ml zkumavky bylo přidáno 9 ml PBS. Obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Dále byly připraveny dvě 15ml zkumavky, do kterých bylo napipetováno 6 ml separačního média Ficoll-Paque. Do každé z těchto připravených zkumavek bylo opatrně navrstveno 9 ml naředěné krve. Poté byly zkumavky centrifugovány při 1 000 g a teplotě 20 °C po dobu 15 minut s minimálním rozjezdem a brzdou. Po centrifugaci byla odebrána frakce mononukleárních buněk tvořící prstenec na rozhraní fází, do 50ml zkumavky. Poté bylo do zkumavky přidáno 30 ml PBS a suspenze byla centrifugována při 480 g a teplotě 20 °C po dobu 10 minut. Následně byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna v 1 ml PBS s 60 % albuminem. Po určení koncentrace buněk byly buňky naředěny na koncentraci $20-60 \times 10^6/\text{ml}$ (podle celkového množství buněk tak, aby vznikly alespoň 4 aliquoty) a aliquotovány po 0,5 ml do kryozkumavek. K suspenzi buněk bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného kryomédia ve složení 20 % DMSO + 40 % albumin v PBS a zkumavky byly ihned vloženy na led. Detaily samotného zamrazení viz následující kapitola 3.4 druhý odstavec.

3.4 Zamrazení buněk

Následujícím způsobem byly zamrazeny iNKT buňky a nádorové buněčné linie. Prvním krokem zamrazení buněk bylo připravení příslušného kryomédia (nádorové buněčné linie: 80 % FBS + 20 % DMSO; pro invariantní NKT buňky: 20 % DMSO a 40 % albumin v PBS) a jeho vychlazení alespoň 20 minut v lednici. Ze suspenze buněk byl odebrán vzorek a určena koncentrace. Buňky byly centrifugovány při 300 g a teplotě 20 °C po dobu 8 minut. Peleta byla rozvolněna v rozvolňovacím roztoku (60 % albumin + 40 % PBS) tak, aby finální

koncentrace byla $1,5 \times 10^6/\text{ml}$. Do každé předem označené kryozkumavky (název, koncentrace, datum, případně identifikace dárce) bylo napipetováno 0,5 ml suspenze buněk a 0,5 ml ledového kryomédia a byly ihned vloženy na led.

Buňky byly zamrazeny pomocí řízeného zamrazovače, který zajišťuje postupné klesání teploty ($-1\text{ }^\circ\text{C}$ za 1 min) až na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Po zamrazení byly buňky uloženy do tekutého dusíku.

3.5 Rozmrazení buněk

Postup rozmrazení je pro všechny používané buňky stejný. Před začátkem postupu bylo připraveno rozmrazovací médium (20 % FBS + 1 % ATB v RPMI) – 10 ml na jeden aliquot. Médium bylo vytemperováno spolu s vodní lázní v inkubátoru na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Rozmrazovací médium bylo rozděleno po 10 ml do 15ml centrifugačních zkumavek. Na jeden aliquot buněk připadala jedna centrifugační zkumavka. Poté byly buňky vyjmuty z tekutého dusíku a rozmrazeny ve vodní lázni (cca 5 minut) až do úplného rozpuštění ledu. Dále byl k rozmrazenému vzorku pomalu přikapáván 1 ml rozmrazovacího média z předem připravené 15ml centrifugační zkumavky s médiem a obsah kryozkumavky byl opatrně přenesen do této 15ml zkumavky. Pomocí 1 ml rozmrazovacího média byla kryozkumavka vypláchnuta a obsah opět přenesen do stejné 15ml centrifugační zkumavky. Takto rozmrazené buňky ve zkumavce byly centrifugovány při 300 g a při $20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 7 minut.

Po rozmrazení mononukleárních buněk bylo dále pokračováno izolací iNKT buněk (viz 3. 6), po rozmrazení iNKT buněk cytotoxickými testy (viz 3. 14), imunomodulačními testy (viz 3. 15) nebo stanovením imunofenotypu (viz 3. 12), po rozmrazení nádorových buněčných linií testy cytotoxickými (3. 14).

3.6 Izolace iNKT buněk (magnetická separace)

Izolace invariantních NKT buněk probíhá z rozmrazených aliquot mononukleárních buněk zdravých dárců. Princip izolace iNKT spočívá v tom, že se na iNKT naváže protilátka s magnetickými mikročásticemi, díky kterým se iNKT váží na magnetickou kolonu, ze které jsou následně vytlačeny. Ty buňky, které se nenaváží, tj. protečou kolonou, jsou později ozářeny a použity jako feeder.

Před začátkem izolace byl připraven promývací roztok (10 % albuminu + 1 % ATB v RPMI) – cca 30 ml na jeden aliquot buněk. Promývací roztok byl uložen v lednici až do jeho použití.

Izolace iNKT z mononukleárních buněk s koncentrací do $15 \times 10^6/\text{ml}$

U mononukleárních buněk s koncentrací do $15 \times 10^6/\text{ml}$ (v případě vyšší koncentrace viz níže) byl supernatant slit a peleta obsahující buňky rozvolněna v 350 μl promývacího roztoku, který byl po použití opět uložen do lednice. Vzniklá suspenze rozmrazených buněk (350 μl) byla přenesena do 50ml zkumavky a umístěna do lednice na 5 minut. Poté bylo přidáno 70 μl magnetických mikročastic s protilátkou a zkumavky byly ihned vloženy do lednice na 15 minut. Během inkubace byly umístěny dvě magnetické kolony do magnetického stojanu. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml promývacího roztoku, který již mohl být ponechán při pokojové teplotě. Buňky v 50ml zkumavce byly centrifugovány při 300 g při teplotě 20 °C 7 minut. Mezitím byla promyta první magnetická kolona 3 ml promývacího roztoku. Po centrifugaci byl důkladně odstraněn supernatant a peleta byla rozsuspendována v 500 μl promývacího roztoku. Vzniklá suspenze buněk byla přenesena na magnetickou kolonu, pod kterou byla umístěna 15ml zkumavka označená FT1 (flow through 1). Po protečení suspenze byla kolona třikrát promyta 3 ml promývacího roztoku. Tímto způsobem protekly téměř všechny mononukleární buňky, kromě invariantních NKT buněk, které byly navázány v magnetické koloně. Kolona byla přemístěna na prázdnou 15ml zkumavku. Druhá kolona byla promyta stejným způsobem jako ta první. Dále bylo aplikováno 5 ml promývacího roztoku pomocí sérologické pipety na první kolonu, ihned byl stlačen píst, a tak byly buňky vytlačeny z magnetické kolony. Proteklá suspenze byla přenesena na druhou kolonu, pod kterou byla umístěna 15ml zkumavka s označením FT2 (flow through 2). Kolona byla promyta dvakrát 3 ml promývacího roztoku a po překapání veškerého obsahu přenesena na další prázdnou 15ml zkumavku s označením iNKT. Na kolonu bylo opět aplikováno 5 ml promývacího roztoku pomocí sérologické pipety a ihned byl stlačen píst. Tímto způsobem byla získána suspenze buněk o převládajícím zastoupení iNKT.

Následně byly centrifugovány zkumavky s označením FT1, FT2 a iNKT při 300 g a 20 °C po dobu 6 minut. Pelety byly rozsuspendovány v iNKT médiu v následujících objemech: FT1 v 5 ml, FT2 a iNKT v 0,5 ml. Dále byly buňky FT1 naředěny 10 \times iNKT médiem. Buňky ředěného FT1 a iNKT byly spočítány v Bürkerově komůrce a byla tak stanovena jejich koncentrace. Naředěná suspenze buněk FT1 byla ozářena gamma zářením o síle 25 Gy a použita jako feeder pro iNKT. Na závěr byl odebrán vzorek 50 μl z FT1, FT2 a iNKT do FACS zkumavek a tyto vzorky byly měřeny v průtokovém cytometru – viz bod 3. 7.

Izolace iNKT z mononukleárních buněk s koncentrací vyšší než $15 \times 10^6/\text{ml}$

U buněk s koncentrací vyšší než $15 \times 10^6/\text{ml}$, nebo v případě aliquotů o objemu 2 ml se postup izolace lišil v několika krocích. Peleta obsahující buňky byla po první centrifugaci rozvolněna v 700 μl rozmrazovacího roztoku a tato suspenze byla rozdělena do dvou 50ml zkumavek po 350 μl . Po uložení zkumavek do lednice na 15 minut bylo přidáno 70 μl magnetických mikročastic s protilátkou do každé ze zkumavek. Dále probíhala magnetická izolace buněk obou zkumavek zvlášť, bylo tedy potřeba čtyř magnetických kolon. Po protečení suspenzí buněk kolonami byly obsahy zkumavek slity. Zbytek postupu se neliší od postupu uvedeného výše.

3.7 Měření čistoty iNKT buněk na průtokovém cytometru

Po izolaci iNKT buněk bylo stanoveno jejich zastoupení na průtokovém cytometru. Spolu s iNKT buňkami byly změřeny i vzorky FT1 a FT2 získané během izolace (viz 3. 6). K 50 μl vzorku byly přidány protilátky podle Tab. I a dále bylo postupováno podle bodu 3. 8. Takto byla ověřena úspěšná izolace iNKT a stanovena čistota (procentuální zastoupení iNKT mezi T-lymfocyty), tu bylo potřeba znát pro následující nasazení kultury iNKT na kultivační destičku.

Tab. I: Protilátky pro určení základních znaků iNKT.

Protilátka	CD45	CD3	TCRV β 11	TCR V α 24-J α 18	7AAD
Flourofor	BV510	FITC	APC	PE	NA

3.8 Obecný postup přípravy vzorků a jejich měření na průtokovém cytometru

Buňky s protilátkami byly inkubovány 20 minut ve tmě. Následně byly přidány 3 ml PBS a zkumavky se vzorky byly centrifugovány při 350 g po dobu 5 minut. Poté byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna v 300 μl filtrovaného PBS. Na závěr proběhlo samotné měření na průtokovém cytometru a vyhodnocení výsledků.

3.9 Nasazení kultury iNKT buněk na kultivační destičku

Pro nasazení kultury iNKT buněk spolu s médiem, ozářeným feederem, α -GalCer a IL-15 bylo nejprve potřeba vypočítat objemy jednotlivých složek. Na základě měření čistoty iNKT (viz bod 3. 7) byla spočítána jejich skutečná koncentrace v získaných 500 μl . Bylo nasazeno 10 000 buněk na jednu jamku kultivační destičky. Ozářený feeder byl přidán v poměru 1 : 1 k iNKT buňkám. V jedné jamce kultivační destičky bylo celkem 200 μl směsi

buněk (tzn. iNKT + feeder + iNKT médium). Dále byl přidán IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml) a α -GalCer (finální koncentrace 1 μ l/ml), který byl nejprve naředěn 10 \times do iNKT média. Takto připravená směs iNKT buněk, feederu, iNKT média, IL-15 a α -GalCer byla nasazena na kultivační destičku s kulatým dnem (200 μ l směsi do jedné jamky). Jamky po obvodu destičky byly vyplněny médiem s antibiotiky, aby nedocházelo k vysychání suspenze. Buňky na destičce byly kultivovány při 5% CO₂ několik týdnů, během kterých byla udržována jejich viabilita (viz dále).

3. 10 Kultivace a zamrazení iNKT buněk

Během kultivace iNKT bylo potřeba podpořit jejich viabilitu a dělení. Tyto buňky se inkubují 2 – 4 týdny. Na základě posouzení vzhledu pelety v jamce bylo vyměněno médium s IL-15, nebo bylo provedeno pasážování kultury.

Výměna média a přidání IL-15

Po prvním týdnu kultivace bylo potřeba přidat iNKT médium s IL-15 a to následujícím způsobem. Nejprve bylo odebráno z každé jamky 100 μ l média, které bylo v jamce nad buňkami. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 μ l iNKT média s dvojnásobnou koncentrací IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

Pasážování buněčné kultury

Pokud byla kultura velmi narostlá, bylo provedeno pasážování a to tak, že z každé jamky bylo přeneseno 100 μ l suspenze buněk (nutno promíchat pipetou) do prázdné jamky. Vzniklo tak dvojnásobné množství jamek obsahujících buňky. Poté se do všech jamek přidalo 100 μ l média pro iNKT s dvojnásobnou koncentrací IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

Po dokončené kultivace byly iNKT buňky zamrazeny podle kroku 3. 4.

3. 11 Rozmrazení iNKT buněk a jejich rekultivace

Rozmrazení iNKT probíhalo podle kroku 3. 5. Následně byly buňky rozvolněny v 5 ml iNKT média s IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml) a přeneseny po 2,5 ml do dvou 15ml kultivačních zkumavek, kde byly ponechány přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C. Následně byly iNKT buňky použity pro další testování (viz níže).

3. 12 Stanovení imunofenotypu

Stanovení imunofenotypu iNKT buněk proběhlo po jejich rozmrazení a rekultivaci (krok 3. 11). Poté bylo odebráno asi 50 000 buněk, ke kterým byly přidány protilátky podle následující tabulky (Tab. II). Dále byl dodržen postup kultivace a měření podle kroku 3. 8.

Tab. II: Seznam protilátek pro stanovení imunofenotypu iNKT buněk.

Protilátka	CD4	CD8	NKG2D (CD314)	CD25	CD62L	TCR V α 24J α Q (6B11)	CD45RO	CD45RA
Flourofor	APC- Cy7	FITC	PE	PE- Cy7	APC	BV421	BV510	PerCP Cy5.5

3. 13 Značení nádorových buněčných linií CFSE próbou

Nádorové buněčné linie byly obarveny fluorescenční próbou pro použití při cytotoxických testech. Během celého postupu bylo potřeba pracovat beze světla.

Pro tento pokus byly použity čtyři nádorové buněčné linie: RAJI (lymfom), H929 (myelom), KG1a (myeloidní leukémie) a K562 (chronická myeloidní leukémie)

Složení kultivačních médií pro jednotlivé nádorové linie:

- RAJI a K562: 10 % FBS + 1 % ml ATB do RPMI
- H929: 10 % FBS + 1 % ATB + 1 % L-Glutamin + 0,1 % merkaptoethanol do RPMI
- KG1a: 10 % FBS + 1 % ATB do IMDM

Prvním krokem bylo rozmrazení nádorových linií podle bodu 3. 5. Buňky byly poté kultivovány po dobu 10 dní v kultivačním médiu a udržovány v koncentraci $0,3 \times 10^6$ /ml. Po kultivaci bylo odebráno $10\text{--}15 \times 10^6$ buněk. K buňkám byly přidány 4 ml PBS a byly centrifugovány při 350 g po dobu 8 minut. Během centrifugace byla rozpuštěna CFSE próba v 18 μ l DMSO a přenesena do 45 ml PBS. Po centrifugaci byl slit supernatant a peleta rozvolněna v 1 ml PBS s fluorescenční próbou. Obratem byla přidána další část PBS s próbou tak, aby finální koncentrace buněk byla 1×10^6 /ml. Dále byly nádorové linie s próbou inkubovány při 37 °C 20 minut. Po inkubaci bylo přidáno 20 ml PBS a zkumavky byly centrifugovány při 350 g po dobu 8 minut. Peleta byla rozvolněna v příslušném kultivačním médiu tak, aby koncentrace byla $0,5 \times 10^6$ /ml. Poté byly značené nádorové linie kultivovány při 37 °C 24 hodin, následně byly zamrazeny (viz 3. 4) a připraveny pro cytotoxické testy (viz 3. 14).

3. 14 Cytotoxické testy

Principem cytotoxických testů bylo inkubovat samostatně iNKT buňky deseti dárců spolu se čtyřmi různými fluorescenčně značenými nádorovými buněčnými liniemi v pěti různých poměrech. Byla měřena viabilita nádorových buněk (marker 7-AAD) na průtokovém cytometru po 24 a 48 hodinách.

Pro tento pokus byly použity tyto CFSE značené nádorové buněčné linie: RAJI, H929, KG1a a K562. Postup jejich barvení fluorescenční próbou je popsán v kroku 3. 13.

Den 1 – Rozmrazení iNKT buněk a CFSE značených nádorových linií

První den byly rozmrazeny a rekultivovány iNKT buňky a CFSE značené nádorové buněčné linie. Rozmrazení probíhalo podle kroku (3. 5.). Rozmrazené iNKT buňky byly rozvolněny v 5 ml iNKT média s IL-15 (finální koncentrace 150IU/ml) a přeneseny po 2,5 ml do dvou 15ml kultivačních zkumavek. Rozmrazené nádorové buněčné linie byly rozvolněny v 5 ml příslušného média dané linie (požadovaná koncentrace 1×10^6 /ml). Buňky i linie byly ponechány přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C.

Den 2 – Příprava na inkubaci iNKT buněk s nádorovými liniemi

Druhý den byly iNKT buňky inkubovány s každou nádorovou linií zvlášť. Nejprve byla stanovena koncentrace všech používaných buněk a byly vypočítány potřebné objemy. Každá nádorová buněčná linie byla smíchána s iNKT buňkami v pěti poměrech: 1 : 0,5; 1 : 1; 1 : 5; 1 : 10 a 1 : 20. Celkový objem každého vzorku byl 200 μ l. Celá sada vzorků byla připravena jednou pro měření po 24 h a po druhé pro měření po 48 h. Také byly připraveny kontroly (200 μ l) ke každé nádorové linii a timepointu, která neobsahovala iNKT buňky.

Den 3 a 4 – Měření na průtokovém cytometru

Třetí a čtvrtý den probíhalo měření po 24 h a 48 h od počátku inkubace iNKT spolu s nádorovými buněčnými liniemi. 7-AAD bylo použito pro rozlišení mrtvých a živých buněk. Měření bylo prováděno po deseti vzorcích. Ke každému celému vzorku bylo přidáno 7 μ l 7-AAD, následně bylo pokračováno podle kroku 3. 8. Na průtokovém cytometru byly změřeny všechny buňky vzorku.

3. 15 Imunomodulační testy

Principem imunomodulačních testů bylo stanovení míry aktivace mononukleárních buněk, které byly stimulovány pomocí alogenních buněk a následně ko-kultivovány s autologními iNKT.

Den 1 - Rozmrazení MNC a feederu a jejich nasazení na kultivační destičku

Během imunomodulačních testů byly použity mononukleární buňky deseti dárců. Pro aktivaci buněk byl použit vždy stejný vzorek, který vznikl spojením MNC pěti dárců (dále jako feeder). Tento feeder, který sloužil jako aktivátor MNC všech dárců, byl později ozářen, čímž buňky ztratily svou funkci proliferovat. Feeder a MNC byly rozmrazeny podle kroku 3. 5. Poté byly pelety všech vzorků rozvolněny v 1 ml iNKT média a byla určena jejich koncentrace. Požadovaná koncentrace MNC byla 1×10^6 /ml buněk. Pro tento pokus byly odebrány 2×10^6 MNC do iNKT média od každého dárce. Požadovaná koncentrace feederu byla také 1×10^6 /ml a pro celý pokus bylo potřeba celkem 20×10^6 buněk feederu v iNKT médiu. Feeder byl ozářen gamma zářením o síle 25 Gy. Směs mononukleárních buněk, feederu a IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml) byla nasazena na 24 jamkovou kultivační destičku v poměru 1 : 1 (MNC : feeder). Od každého z deseti dárců byly nasazeny 2×10^6 MNC. Buňky na destičce byly kultivovány při 5% CO₂ jeden týden.

Den 3 a den 5 – Přidání IL-15 a výměna iNKT média

Třetí den kultivace buněk byl z každé jamky odebrán 1 ml média a přidán 1 ml iNKT média s IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

Pátý den byly odebrány suspenze buněk každého dárce a změřena koncentrace buněk. Poté byly nasazeny buňky o koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml. Takto byly nasazeny 2×10^6 buněk od každého dárce. Ke všem buňkám byl opět přidán IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml).

Den 8 – Barvení mononukleárních buněk CFSE próbou a rozmrazení iNKT

Osmý den kultivace byly odebrány všechny buňky (4 ml od každého dárce) do 15ml centrifugačních zkumavek. Dále byla změřena jejich koncentrace na analyzátoru a bylo odebráno 2×10^6 pro následné barvení.

Suspenze 2×10^6 mononukleárních buněk byla centrifugována při 350 g a 20 °C po dobu 8 min. Mezitím byla rozpuštěna CFSE próba v 18 µl DMSO a 10 µl próby bylo přeneseno do 45 ml PBS. Po centrifugaci byl slit supernatant a peleta byla rozvolněna v 2 ml PBS s fluorescenční próbou. MNC s próbou byly inkubovány 20 minut ve tmě. Poté proběhlo

promytí buněk a to tak, že ke každé bylo přidáno 20 ml PBS a buňky centrifugovány při 350 g a 20 °C po dobu 8 min. Po centrifugaci byla peleta rozvolněna ve 4 ml iNKT média a byl přidán IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml). Fluorescenčně značené mononukleární buňky byly přeneseny do 15ml kultivačních zkumavek a byly inkubovány při 37 °C do druhého dne, kdy byly použity pro další postup.

Spolu s mononukleárními buňkami deseti dárců byly později inkubovány příslušné autologní invariantní NKT buňky. Tyto iNKT od deseti dárců byly osmý den rozmrazeny. Rozmrazování probíhalo podle kroku 3.5 a buňky byly poté rozvolněny v 1 ml iNKT média. Následně byl nasazen 1×10^6 iNKT buněk v 1 ml iNKT média spolu s IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml) do 15ml kultivačních zkumavek. Buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C do druhého dne.

Den 9 – Příprava na inkubaci MNC s iNKT

Devátý den byly připraveny suspenze MNC a alogenních iNKT v poměru 1 : 1 (500 000 MNC : 500 000 iNKT) a 1 : 0,5 (500 000 MNC : 250 000 iNKT). Byly připraveny kontroly pro každého dárce obsahující 5×10^5 fluorescenčně značených MNC bez přidání iNKT. Všechny vzorky byly doplněny do 1 ml iNKT médiem a byl přidán IL-15 (finální koncentrace 150 IU/ml). Všechny buňky byly inkubovány při 37 °C následující tři dny, kdy byly denně měřeny na průtokovém cytometru.

Den 10, 11, 12 – Měření na průtokovém cytometru

Měření na průtokovém cytometru probíhalo 24, 48 a 72 hodin od společné inkubace aktivovaných MNC a iNKT buněk. Každé měření probíhalo následovně. Bylo odebráno 300 μ l vzorku a centrifugováno při 350 g a 20 °C po dobu 8 min. Poté bylo odebráno 200 μ l média a peleta byla rozvolněna ve zbývajících 100 μ l. Ke každému vzorku byly přidány protilátky podle následující tabulky (Tab. III) a následoval postup podle kroku 3. 8. Na průtokovém cytometru byl proměřen celý vzorek.

Tab. III: Seznam protilátek pro vyhodnocení imunomodulačních testů.

Protilátka	CD45	CD25	HLA-DR	7-AAD
Fluorofor	BV510	APC	BV421	NA

3.16 Zpracování dat

Flowcytometrické výsledky byly hodnoceny v programu FlowJo, LLC. Pro grafické zobrazení dat byl použit software Microsoft Excel. Statistika byla provedena ve spolupráci s Bc. Martinem Lebou ze Západočeské univerzity v Plzni, Fakulta aplikovaných věd. Pro zhodnocení cytotoxických testů byl použit Mann-Whitney U-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (nezávislá data, Wilcoxon rank sum test). Pro zhodnocení imunomodulace byl použit Wilcoxon test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (závislá data, Wilcoxon signed rank test). Statistika byla hodnocena v software MatLab.

4 Výsledky

4.1 Izolace a kultivace iNKT buněk

Izolované iNKT buňky byly specificky stimulovány α GalCer v kombinaci s ozářenými autologními mononukleárními buňkami. Po expanzi trvající 3–4 týdny byly buňky zamrazeny. V den zamrazení byla stanovena jejich koncentrace a zastoupení (tj. čistota). Průměrný počet buněk se zvýšil 250 \times . Hodnota minimálního nárůstu počtu buněk od začátku do konce kultivace byla 60 \times a maximální 413 \times (viz Tab. IV). U všech vzorků byla detekována velká čistota populace iNKT buněk dosahující přes 90 %. Nejvyšší zaznamenaný nárůst čistoty iNKT buněk byl o 77 %. U dárce i7 došlo ke zvýšení zastoupení z 13 % na 90 % (viz Tab. IV). Zbytkové buňky reprezentovaly T-lymfocyty.

Tab. IV: Tabulka obsahující koncentrace a čistotu iNKT buněk po izolaci a po kultivaci všech izolovaných dárců.

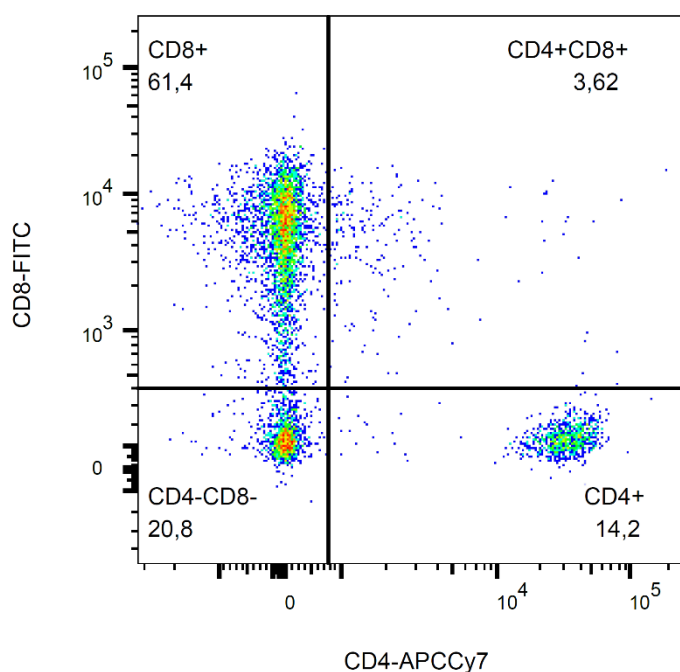
dárce	koncentrace [buněk/ml]			čistota iNKT buněk [%]		
	po izolaci	po kultivaci	násobek nárůstu	u izolace	po kultivaci	nárůst o
č. 1	160 000	13 500 000	84	91	99,6	8,6
č. 2	200 000	12 000 000	60	87	99,4	12,4
č. 3	110 000	33 000 000	300	56	91,7	35,7
č. 4	50 000	10 500 000	210	50	99,7	49,7
č. 5	70 000	25 500 000	364	71	99,9	28,9
č. 6	80 000	15 000 000	188	72	96,7	24,7
č. 7	30 000	9 000 000	300	13	90	77
č. 8	40 000	9 000 000	225	77	99,5	22,5
č. 9	40 000	16 500 000	413	69	99,9	30,9
č. 10	50 000	19 500 000	390	92	99,9	7,9
č. 11	70 000	21 000 000	300	75	99,6	24,6
č. 12	60 000	7 500 000	125	98	99,9	1,9
č. 13	60 000	15 000 000	250	85	99,4	14,4
č. 14	30 000	12 000 000	400	52	99,3	47,3

4.2 Imunofenotyp iNKT buněk

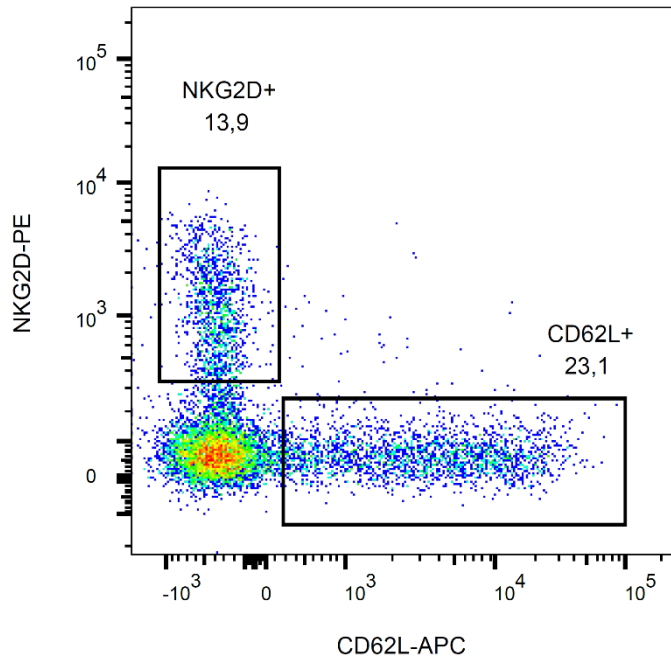
V rámci charakterizace buněk byl stanoven imunofenotyp iNKT buněk deseti zdravých dárců. Byly stanovené CD4⁺ a CD8⁺ subpopulace a dvojitě negativní buňky (viz Obr. 11). Na těchto subpopulacích byly zkoumány další znaky jako je aktivační receptor NKG2D, CD25 – receptor IL-2 a membránový glykoprotein CD62L (viz Obr. 12). Také bylo stanoveno zastoupení paměťových (CD45RO) a naivních buněk (CD45RA) (viz Obr. 13). Byla zaznamenána velká heterogenita v zastoupení jednotlivých subpopulací, u některých dárců byly dominantní CD4⁺ buňky, u některých CD8⁺ a dvojitě negativní buňky. Zastoupení u CD4⁺ buněk se pohybovalo v rozpětí přibližně 1–76 %, u CD8⁺ 0,5–60 % a u dvojitě negativních 17–86 %. Většina iNKT buněk byla paměťových (v průměru 97 %) a zbytek byly naivní buňky. Výjimkou byl dárci i8, kde bylo zastoupení naivních buněk 7 %.

NKG2D receptor byl primárně exprimován na CD8⁺ buňkách, a to průměrně v zastoupení 88 % a na dvojitě negativních buňkách v 78 %. Molekula CD62L byla exprimována hlavně na CD4⁺ a dvojitě negativních buňkách, a to přibližně u 14 % buněk těchto subpopulací. Molekulu CD25 exprimovaly všechny tři subpopulace v podobné míře v rozmezí od 0,1 % do 17 %.

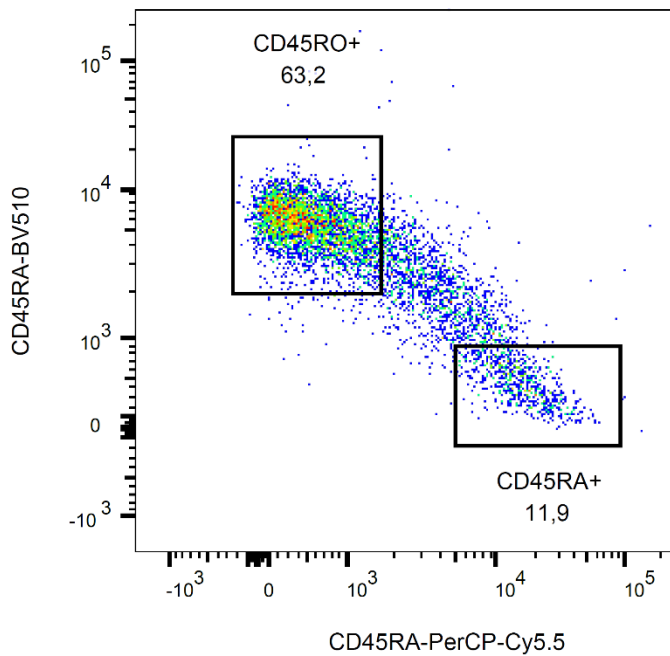
Veškerá primární data jsou v příloze č. 1.



Obr. 11: Reprezentativní příklad hodnocení zastoupení CD8⁺ a CD4⁺ subpopulací a dvojitě negativních iNKT buněk pomocí průtokové cytometrie.



Obr. 12: Reprezentativní příklad hodnocení zastoupení NKG2D a CD62L pozitivních iNKT buněk pomocí průtokové cytometrie.



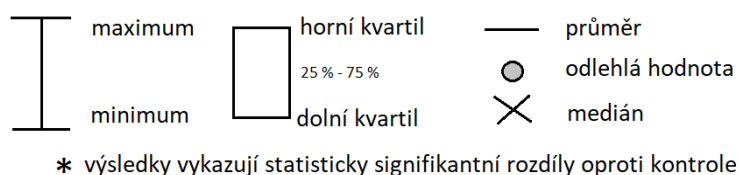
Obr. 13: Reprezentativní příklad hodnocení zastoupení paměťových (CD45RO+) a naivních (CD45RA+) iNKT buněk pomocí průtokové cytometrie.

4.3 Cytotoxické testy

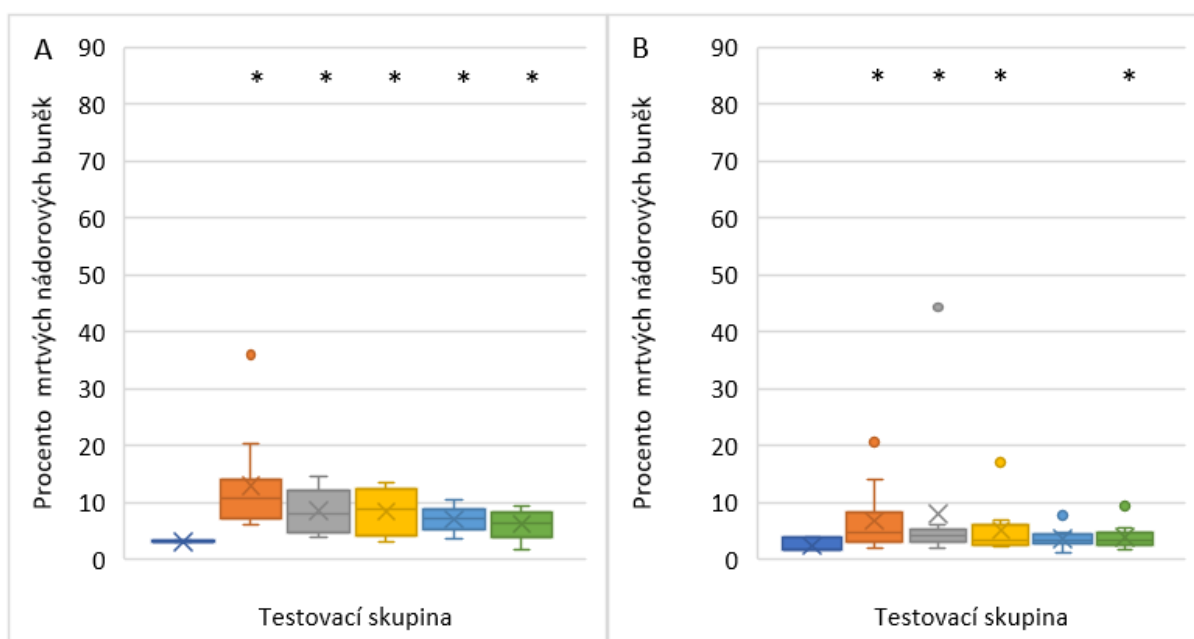
Principem cytotoxických testů byla inkubace invariantních NKT buněk s fluorescenčně značenými nádorovými buněčnými liniemi. Následně bylo měřeno zastoupení nádorových buněk pomocí markeru 7AAD na průtokovém cytometru po 24 a 48 hod. Bylo testováno 10 zdravých dárců iNTK buněk a čtyři nádorové buněčné linie: RAJI, H929, K562 a KG1a. Nádorové buněčné linie a iNKT buňky byly kultivovány s následujícími poměry: 1 : 0,5; 1 : 1; 1 : 5; 1 : 10 a 1 : 20 (nádorová linie : iNKT). U všech vzorků byla připravena negativní kontrola, která obsahovala pouze nádorové linie a neobsahovala iNKT buňky.

U všech linií došlo více či méně k navýšení zastoupení mrtvých nádorových buněk. Tyto rozdíly byly mnohdy se statistickou signifikancí, ale byly velmi malé a jejich biologická relevance je velmi nízká.

Množství mrtvých iNKT buněk po kultivaci s lymfoidní nádorovou buněčnou linií RAJI se od pozitivní kontroly lišilo pouze minimálně, i když rozdíly byly statisticky signifikantní. U této nádorové linie nebyl detekován výrazný cytotoxický efekt po 24 hod. (Obr. 15 A) ani po 48 hod. (Obr. 15 B). Primární data jsou v příloze 2.



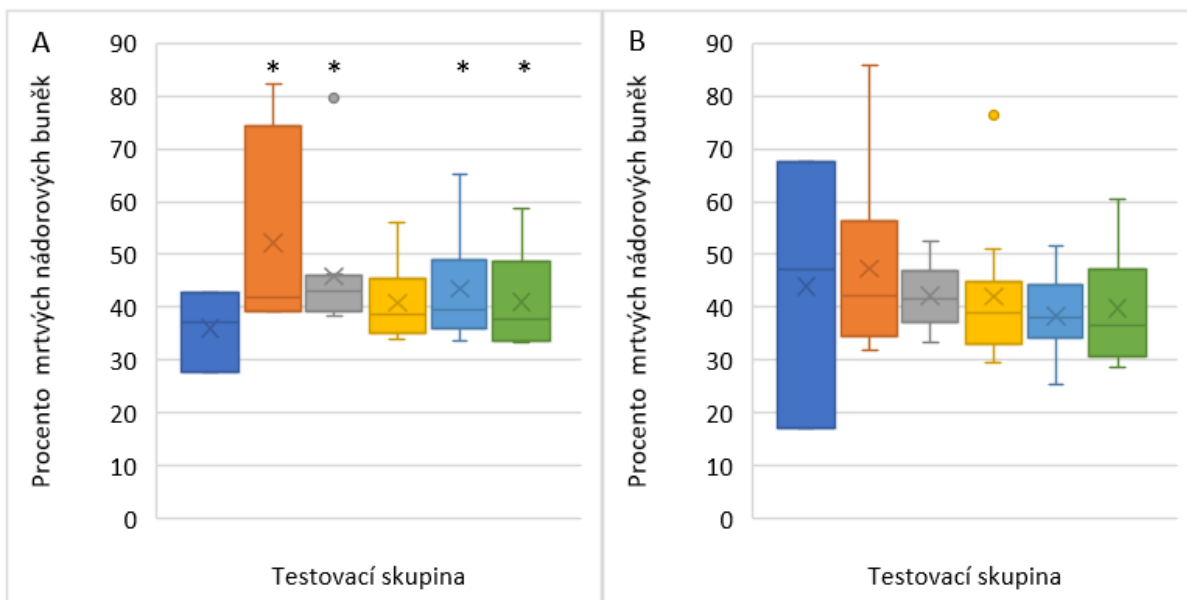
Obr. 14. Vysvětlivky k následujícím grafům.



Obr. 15: Množství mrtvých nádorových buněk RAJI po inkubaci s iNKT buňkami po 24 hod.

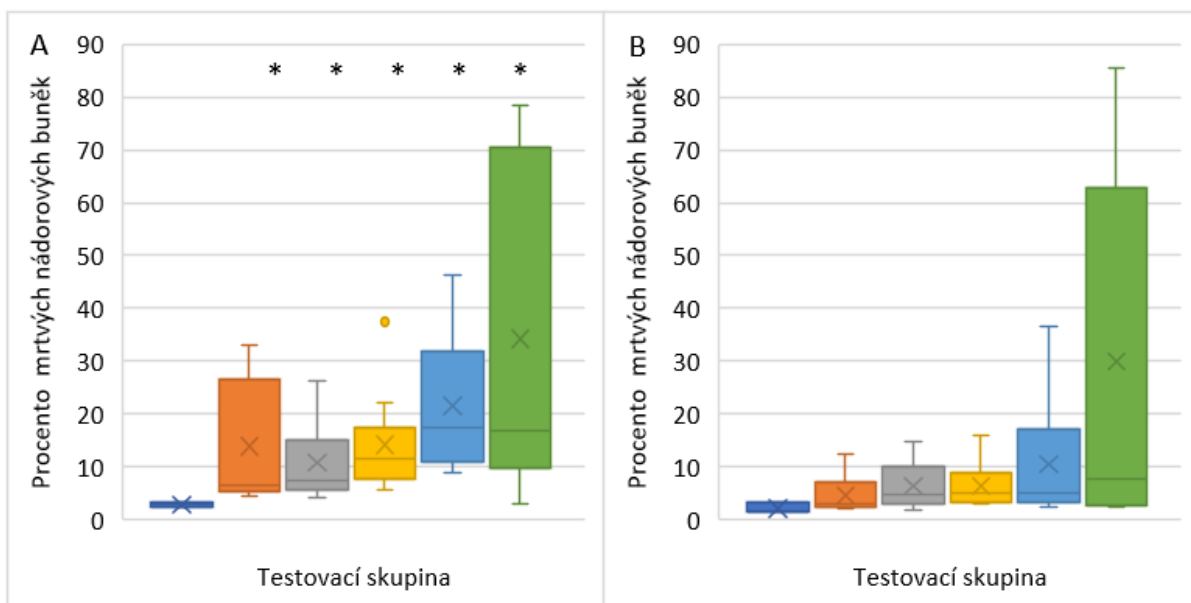
(A) a po 48 hod. (B). ■ CTRL ■ 1 : 0,5 ■ 1 : 1 ■ 1 : 5 ■ 1 : 10 ■ 1 : 20

U nádorové buněčné linie H929 pocházející z mnohočetného myelomu byla výrazně snížena viabilita již v kontrole. Ukázalo se, že tato linie je velmi senzitivní na zvolený přístup detekce a není vhodná pro tyto experimenty (viz Obr. 16). Nicméně i zde jsme zaznamenali signifikantní rozdíly mezi vzorky a kontrolní skupinou, je však nutno počítat se zkreslením dat v důsledku neoptimální viability již kontrolního vzorku. Primární data jsou v příloze 3.



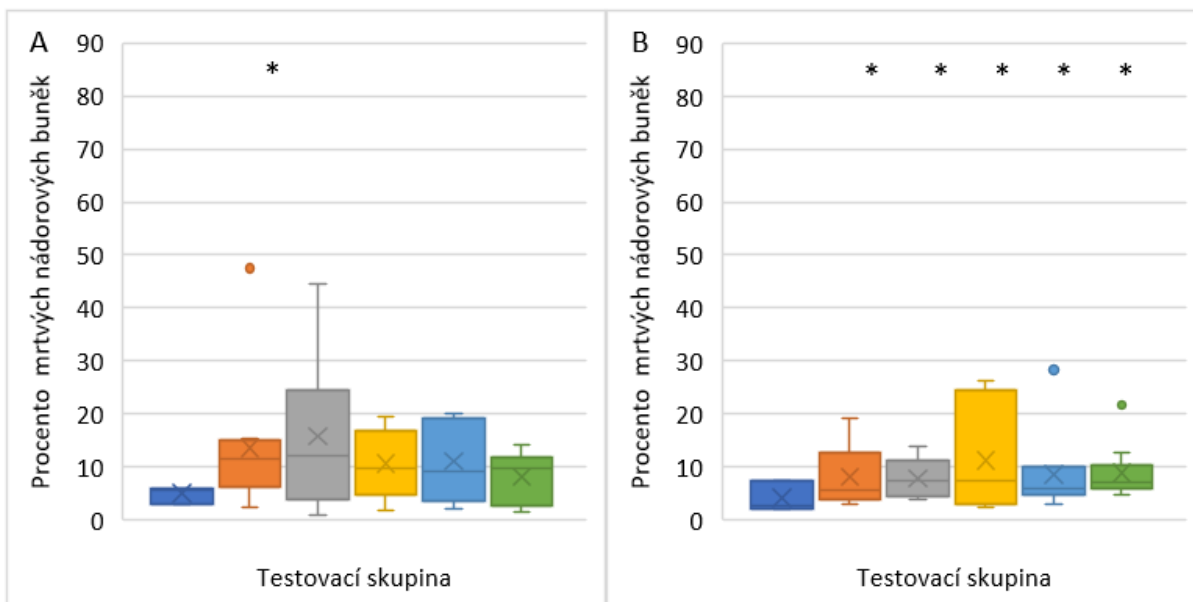
Obr. 16: Množství mrtvých nádorových buněk H929 po inkubaci s iNKT buňkami po 24 hod. (A) a po 48 hod. (B). ■ CTRL ■ 1:0,5 ■ 1:1 ■ 1:5 ■ 1:10 ■ 1:20

U iNKT buněk kultivovaných s nádorovou buněčnou linií K562, která je odvozena od chronické myeloidní leukémie, byl detekován jejich cytotoxický efekt. Po 24 hodinách došlo k nárůstu počtu mrtvých buněk ve všech poměrech, největší a významný nárůst byl u poměru 1 : 20, tedy ve vzorcích s nejvyšším počtem iNKT buněk (viz Obr. 17 A). Po 48 hodinách byly obdobné výsledky, opět s významně nejvyšším počtem mrtvých buněk u poměru 1 : 20, v ostatních poměrech byl zaznamenán mírný nárůst mrtvých buněk oproti kontrole (viz Obr. 17 B). Všechny rozdíly jsou statisticky signifikantní. Primární data jsou v příloze 4.



Obr. 17: Množství mrtvých nádorových buněk K562 po inkubaci s iNKT buňkami po 24 hod. (A) a po 48 hod. (B). ■ CTRL ■ 1:0,5 ■ 1:1 ■ 1:5 ■ 1:10 ■ 1:20

Po kultivaci iNKT s nádorovou buněčnou linií KG1a, která je odvozena z akutní myeloidní leukémie, došlo k mírnému nárůstu počtu mrtvých buněk ve všech poměrech oproti kontrole po 24 hod. i 48 hod. (viz Obr. 18 A), avšak bez jednoznačné statistické signifikance v čase 24 hod., signifikantní rozdíly byly až u 48 hod. měření (viz Obr. 18 B). Veškerá primární data jsou v příloze 5.



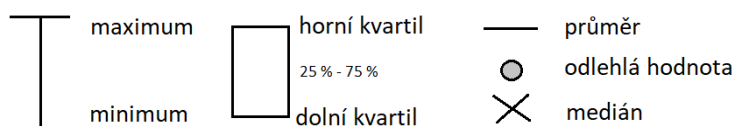
Obr. 18: Množství mrtvých nádorových buněk KG1a po inkubaci s iNKT buňkami po 24 hod. (A) a po 48 hod. (B). ■ CTRL ■ 1:0,5 ■ 1:1 ■ 1:5 ■ 1:10 ■ 1:20

4.4 Imunomodulační testy

V imunomodulačním experimentu byly inkubovány nespecificky aktivované fluorescenčně barvené mononukleární buňky s autologními iNKT buňkami. Pro účely tohoto experimentu byly použity buňky deseti zdravých dárců, které byly inkubovány ve dvou poměrech a to 2 : 1 a 1 : 1 (MNC : iNKT). Měřeny a vyhodnoceny byly následující hodnoty po 24, 48 a 72 hod. od počátku vzájemné kultivace: marker CD25 a jeho intenzita, marker HLA-DR a jeho intenzita a intenzita CFSE.

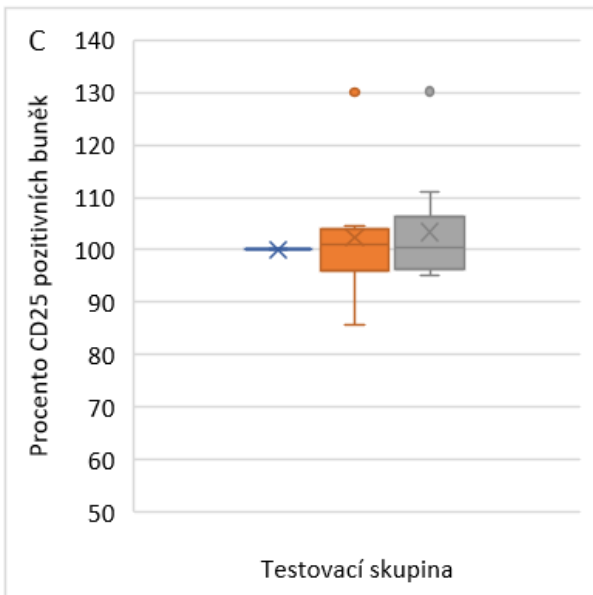
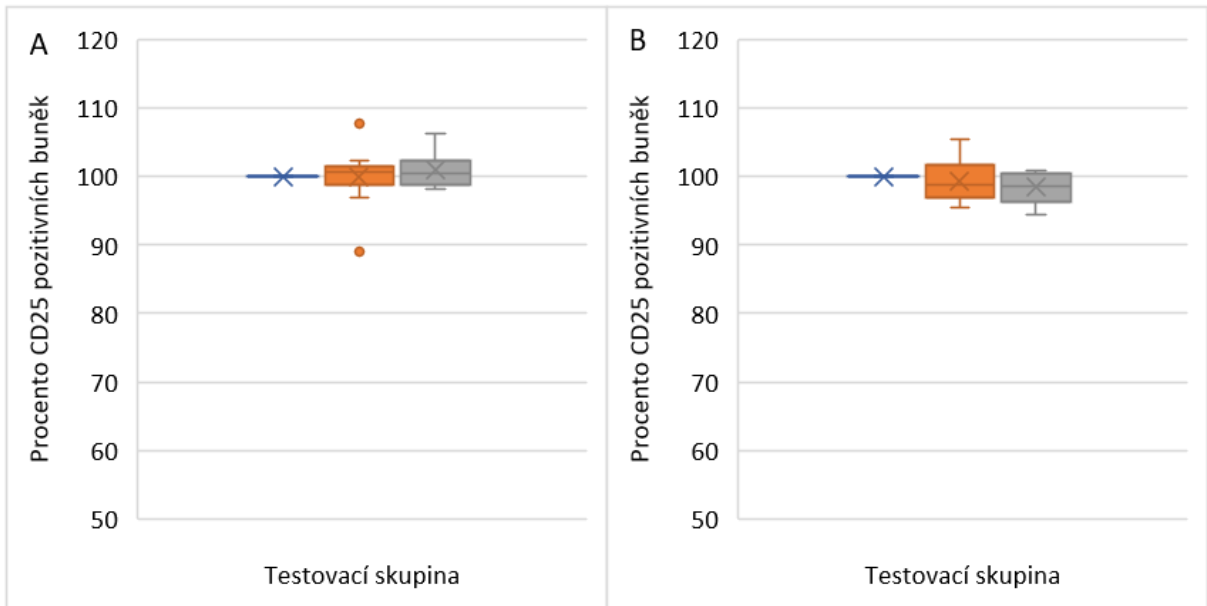
Vzhledem k heterogennímu chování mononukleárních buněk (různý stupeň aktivace jednotlivých dárců) byla pro přehlednější zpracování a snadnější orientaci v grafech použita normalizace dat. Kontrola představuje hodnotu 100 % a u naměřených hodnot byl sledován rozdíl oproti kontrole, což je procentuální rozdíl v hodnotě.

Všechny buňky byly vysoce aktivované a exprimovaly CD25 znak. Nejnižší aktivace dosahovala 87 % u 24 hod., postupem času míra exprese CD25 u některých dárců klesala až na 62 %, což by mohlo vypovídat o nutnosti reaktivace iNKT buněk. Přidání iNKT buněk nezpůsobilo výraznou změnu zastoupení CD25 pozitivních buněk (viz Obr. 20). Signifikantní snížení exprese, tj. snížení intenzity CD25 znaku, bylo zaznamenáno po 48 hod. v poměru 1 : 1. Ostatní změny intenzity vykazovaly sice také sestupný trend, ale bez statistické significance (viz Obr. 21). Veškerá primární data s grafy a data po normalizaci jsou v příloze č. 6 a 7.

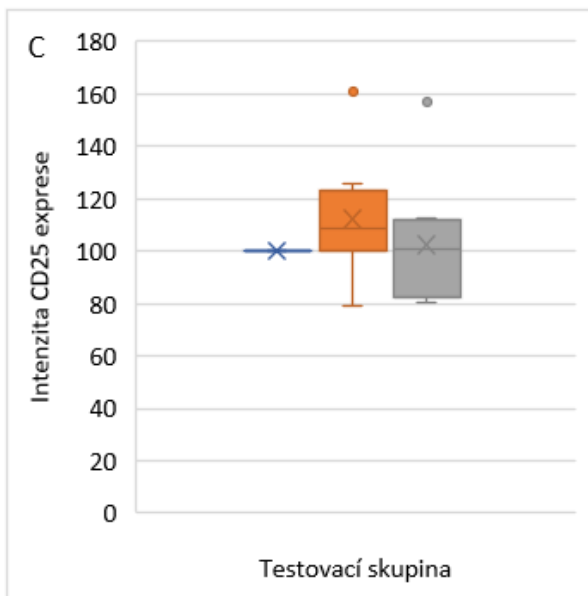
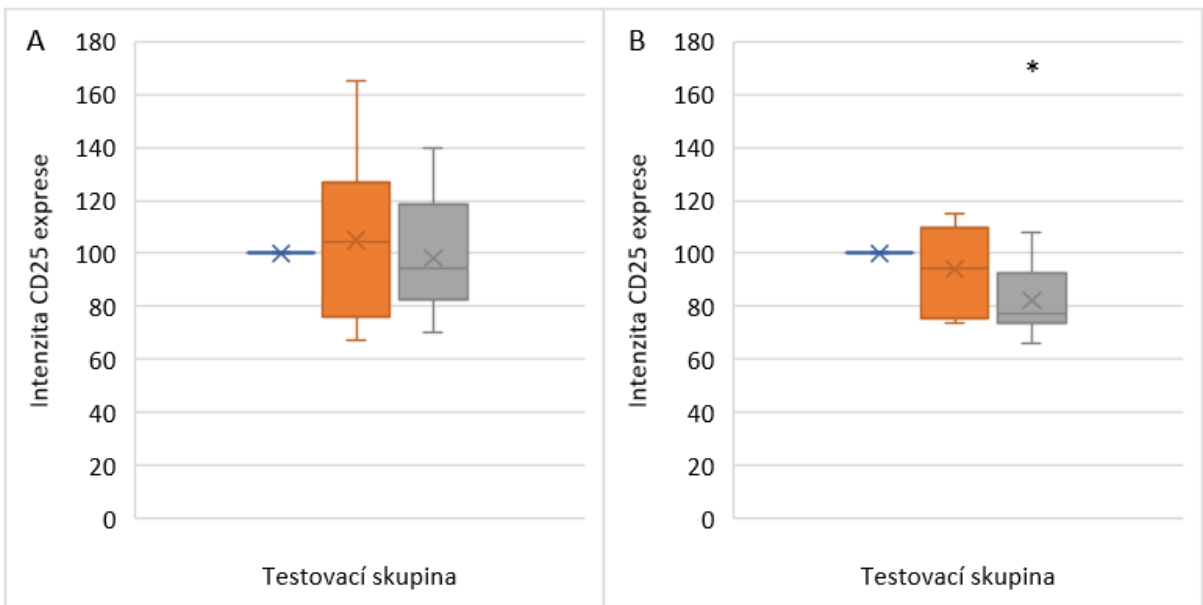


* výsledky vykazují statisticky signifikantní rozdíly oproti kontrole

Obr. 19: Vysvětlivky k následujícím grafům.



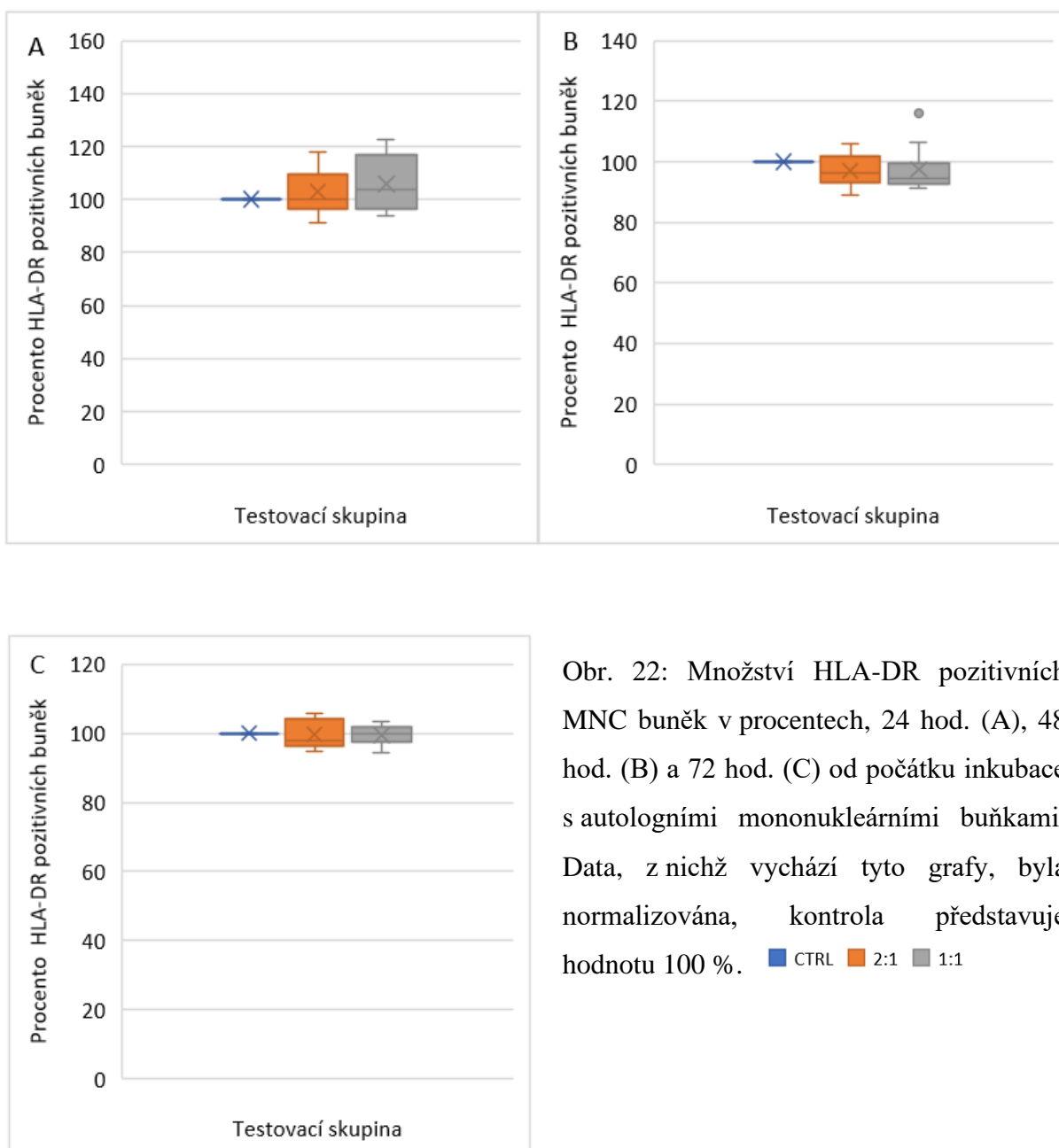
Obr. 20: Množství CD25 pozitivních MNC buněk v procentech, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Data, z nichž vychází tyto grafy, byla normalizována, kontrola představuje hodnotu 100 %. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



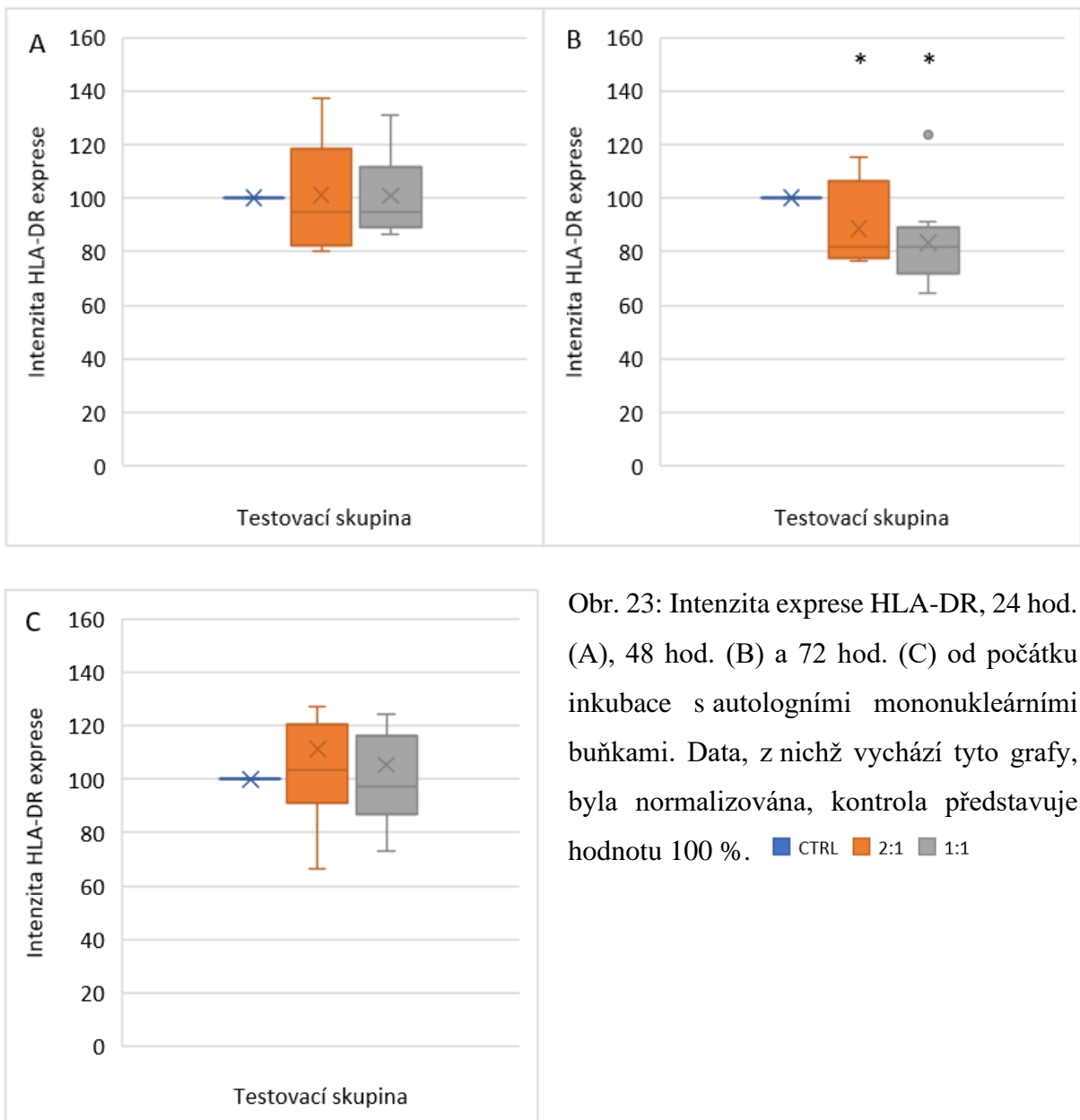
Obr. 21: Intenzita exprese CD25, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Data, z nichž vychází tyto grafy byla, normalizována, kontrola představuje hodnotu 100 %.

■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1

Stejně jako CD25 i HLA-DR bylo exprimované u všech dárců. Byla zde sledována vyšší variabilita, rozmezí HLA-DR pozitivních buněk se pohybovalo přibližně od 50 % až do 80 %. Expres HLA-DR rostla v čase – po 24 hod. bylo průměrné množství HLA-DR pozitivních buněk 62 %, po 48 hod. 71 % a po 72 hod. 77 %. Tento růst byl v přítomnosti iNKT buněk u 48 hod. zpomalen (viz Obr. 22), a zároveň výrazně klesla i intenzita (viz Obr. 23). Opět byly zaznamenány signifikantní rozdíly pouze v čase 48 hod., ale na rozdíl od CD25 intenzity byl pokles exprese HLA-DR pozorován v obou poměrech. Veškerá primární data s grafy a data po normalizaci jsou v příloze č. 8 a 9.

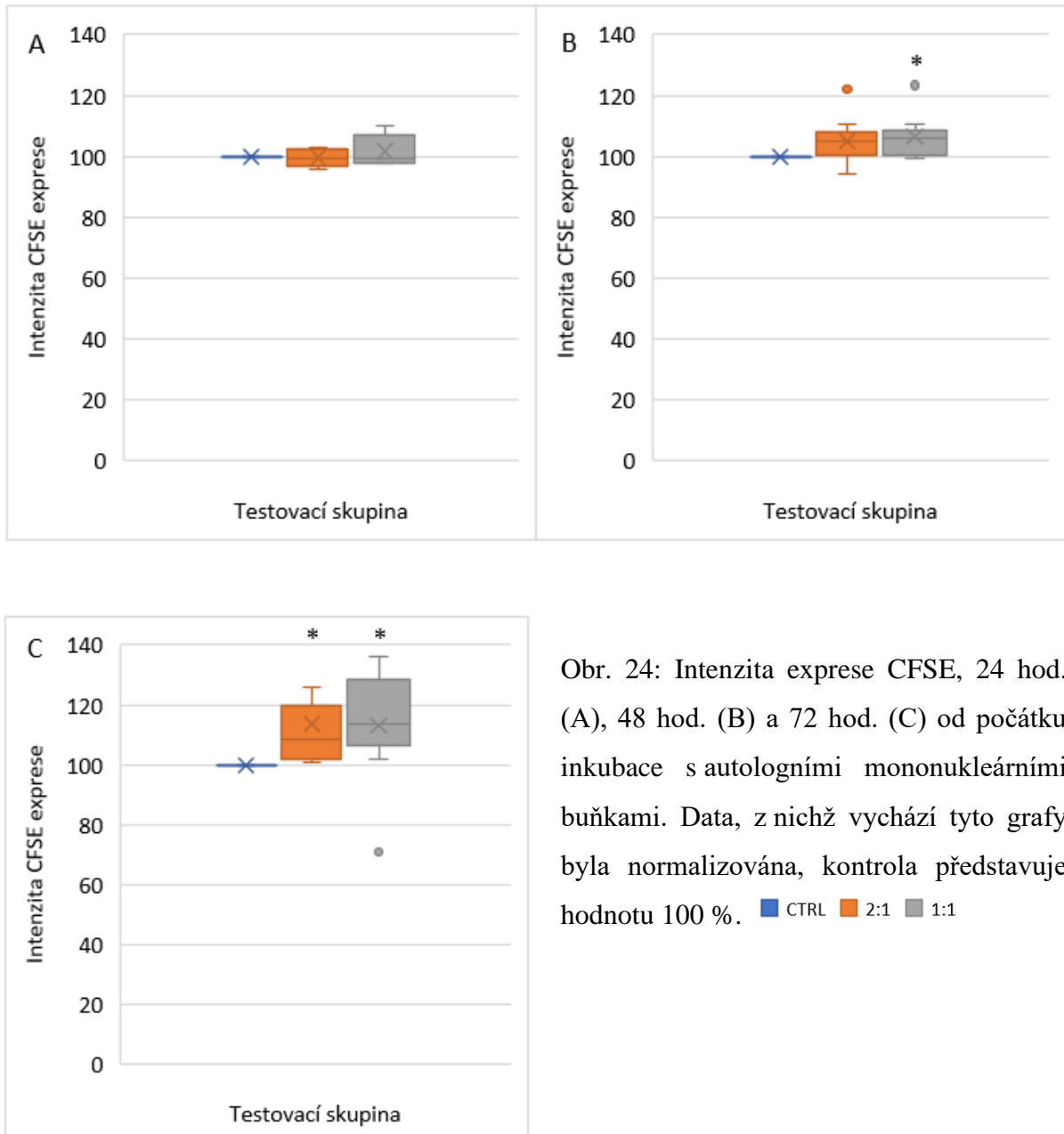


Obr. 22: Množství HLA-DR pozitivních MNC buněk v procentech, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Data, z nichž vychází tyto grafy, byla normalizována, kontrola představuje hodnotu 100 %. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



Obr. 23: Intenzita exprese HLA-DR, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Data, z nichž vychází tyto grafy, byla normalizována, kontrola představuje hodnotu 100 %. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1

CFSE próba je netoxická flourescenční látka, která se v průběhu dělení buněk rozděluje mezi dceřiné buňky, z čehož vyplývá, že čím vyšší flourescenční signál, tím méně se dané buňky dělí. Bylo zjištěno, že intenzita CFSE se oproti kontrole nemění v čase 24 hod. (viz Obr. 24). Po 48 hod. byl zaznamenán malý rozdíl, kdy vzorky s iNKT buňkami vykazovaly vyšší flourescenci. Největší rozdíl byl pak zaznamenán po 72 hod., kde již byla intenzita signálu oproti kontrole výrazně vyšší (viz Obr. 24).



Obr. 24: Intenzita exprese CFSE, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Data, z nichž vychází tyto grafy byla normalizována, kontrola představuje hodnotu 100 %. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1

5 Diskuze

Tato diplomová práce se zabývala invariantními NKT buňkami (iNKT buňky). Tyto buňky jsou jedinečnou subpopulací lymfocytů a vykazují znaky T i NK buněk. Rozpoznávají lipidové antigeny prezentované CD1d molekulou (nepolymorfní neklasická molekula MHC I. třídy). iNKT buňky poznávají tyto antigeny pomocí invariantního NKT buněčného receptoru (iTCR). Invariantní NKT buňky jsou velmi heterogenní populací, přesto existují tři základní podskupiny iNKT buněk – NKT1, NKT2 a NKT17 (Drees *et al.*, 2017). Tyto podskupiny se analogicky objevují i u pomocných linií CD4+ T-lymfocytů (Shissler a Webb, 2019). Ačkoli iNKT buňky nejsou četné, díky jejich jedinečným vlastnostem se stávají důležitou populací regulačních buněk a ovlivňují vývoj imunitních odpovědí. iNKT buňky dokáží vyvolat specifické reakce na antigen produkcí cytokinů a zároveň mohou mít cytotoxickou aktivitu (Cianferoni, 2013). Tyto buňky se podílejí na regulaci různých imunitních reakcí jako jsou reakce proti infekcím a nádorům. Také mají důležitý význam v reakci štetu proti hostiteli, při alergiích a autoimunitních onemocněních (Matsuda *et al.*, 2008; Juno, Keynan a Fowke, 2012).

V rámci této studie byly studovány iNKT buňky zdravých dárců izolovaných magnetickou separací z mononukleárních buněk s následnou *in vitro* expanzí.

Z krve dárců se podařilo úspěšně izolovat iNKT buňky u všech zařazených jedinců. Tyto buňky byly poté kultivovány, zamrazeny a následně testovány. V rámci proliferace buněk byly zaznamenány výrazné rozdíly mezi dárci. Všechny iNKT buňky se sice mnohonásobně namnožily, nicméně některé se namnožily až 400×, jiné 60×. Tato vlastnost velmi rychlé expanze se velmi podobá vlastnostem T-lymfocytů (Bohnenkamp, Hilbert a Noll, 2002) a byla již prokázána v předchozích experimentech (Jiang *et al.*, 2015; Rotolo *et al.*, 2018). Před zahájením kultivace a po jejím skončení bylo měřeno zastoupení iNKT buněk u jednotlivých dárců neboli čistota iNKT buněk po specifické aktivaci pomocí interakcí α -GalCer a CD1d molekuly. Naše výsledky se shodují s předchozími studiemi, kde pomocí tohoto typu aktivace byla získána populace iNKT buněk s vysokou čistotou (Zeng *et al.*, 2013; King *et al.*, 2018 a Zhang *et al.*, 2019). Výhodou v tomto přístupu expanze je také to, že se nepoužívají žádné kostimulační molekuly, které by mohly nechtěně podpořit zbývající T-lymfocyty, které se bez těchto signálů nemnoží (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016). Tímto způsobem bylo ověřeno, že buňky nachystané na následné další testování měly téměř 100% zastoupení ve vzorcích. Výjimkou byl dárci i7, u kterého byla čistota před zamrazením jen 90 %, nicméně

jeho původní čistota byla pouze 13 %, tudíž došlo k vysoce specifické expanzi pouze iNKT buněk.

Stejně jako byly pozorovány rozdíly v růstových vlastnostech buněk, byla pozorována také velká heterogenita v imunofenotypu tj. v zastoupení jednotlivých subpopulací. Rozdělení subpopulací iNKT buněk je podobné jako je tomu u T-lymfocytů. Rozlišujeme základní CD4+, CD8+, dvojitě negativní či pozitivní subpopulace (Keohane E. M. a Smith L. J. Smith, 2016), nicméně stejně jako u T buněk se iNKT diferencují do dalších podskupin jako např. Th1, Th2 a Th17. Na rozdíl od T-lymfocytů, kde je většina buněk spíše CD4+ (Uppal, Verma a Dhot, 2003), je u iNKT buněk rozložení subpopulací jiné. V této studii bylo naměřeno nejvíce dvojitě negativních buněk (DN) a to průměrně 39 %, dále 30 % CD4+ buněk a 27 % CD8+ buněk. Obdobné výsledky byly potvrzeny ve studii od Zeng *et al.*, 2013, kde bylo naměřeno 68 ± 26 % DN buněk, 20 ± 21 % CD4+ buněk a 1 ± 8 % CD8+ buněk (Zeng *et al.*, 2013).

V našem souboru bylo detekováno v průměru 97 % iNKT buněk paměťových (CD45RO) a v průměru 0,3 % byly naivní buňky (CD45RA). Obdobný jev bývá pozorován u T-lymfocytů, kde byly po dlouhodobé kultivaci detekovány hlavně paměťové buňky (Booth *et al.*, 2010). U dárce i8 bylo zastoupení naivních buněk lehce vyšší a to 7 %, zatímco paměťové buňky tvořil pouze 67 %. Tento výsledek prozatím nemá odůvodnění, pro bližší charakterizaci by bylo potřeba dalších pokusů. Dominantní zastoupení naivních iNKT buněk prokázali ve výzkumu od D'Andréa *et al.*, 2000, kde byly zkoumány NKT buňky odvozené z pupečnickové krve, tedy buňky, které se pravděpodobně ještě nesetkali s exogenním stimulem (D'Andréa *et al.*, 2000). Naopak ve studii od Montoya *et al.*, 2007 bylo prokázáno vysoké zastoupení paměťových iNKT buněk ($88,6 \pm 6,4$ %) a nižší procento naivních buněk ($16,8 \pm 7,3$ %), což odpovídá našim výsledkům. Je známo, že primárně paměťové buňky odpovídají spíše efektorovému typu buněk, avšak s velmi nízkým aktivačním stavem - exprese aktivačních znaků iNKT buněk byla např. CD25: $3,5 \pm 2,8$ % a HLA-DR: $0,19 \pm 0,02$ % (Montoya *et al.*, 2007).

V našem souboru jsme měřili expresi funkčních molekul po *in vitro* expanzi: NKG2D, membránového glykoproteinu CD62L a receptoru pro IL-2 CD25.

NKG2D receptor je silný aktivační receptor pro CD8+ lymfocyty a NK buňky. NKG2D rozpoznává stresem indukované povrchové ligandy. V NK buňkách je signalizace NKG2D dostatečná pro uvolnění imunitní odpovědi, v CD8+ T buňkách je vyžadována

souběžná aktivace receptoru T-buněk (Lewis L. Lanier, 2017) např. pomocí CD28, která slouží jako kostimulační signál během aktivace T-buněk. Ukázalo se však, že signály z jiných kostimulačních receptorů, jako je NKG2D, jsou potřebné pro optimální funkci T-buněk mimo fázi aktivace (Prajapati *et al.*, 2018). I v našem souboru byl NKG2D primárně exprimován na CD8+ iNKT buňkách (88 %), což odpovídá i funkci těchto buněk, která je zaměřená hlavně na cytotoxickou aktivitu, což platí i pro dvojité negativní buňky, kde byla exprese NKG2D také vysoká (77 %). NKG2D byl exprimován pouze u průměrně 21 % CD4+ buněk.

Molekulu CD62L exprimovaly primárně CD4+ a dvojité negativní buňky, i když i u těchto dvou subpopulací byla exprese nízká, a to přibližně u 14 % buněk. Tato molekula představuje klíčovou roli v přežití v *in vivo* systému (Wolf, Choi a Exley, 2018) a proto je velmi důležité najít způsob zvýšení její exprese, což se povedlo ve studii Tian *et al.*, 2016, kde bylo prokázáno, že pouze tyto buňky jsou schopny re-expanze po opakované stimulaci (Tian *et al.*, 2016). V naší studii nebyla reaktivace prováděna.

Další zkoumaný marker byla molekula CD25, což je α řetězec receptoru interleukinu 2 (IL-2). IL-2 hraje klíčovou roli v regulaci adaptivního imunitního systému tím, že řídí přežití a proliferaci regulačních T buněk, které jsou potřebné pro udržení imunitní tolerance (Chinen *et al.*, 2016). CD25 receptor je brán jako základní marker aktivace T-lymfocytů, jehož exprese však s časem v kultuře postupně klesá (Hedfors a Brinchmann, 2003). Nízká exprese byla pozorována také u námi aktivovaných iNKT (0,1 - 17 %) buněk, nicméně vzhledem k absenci časosběrné studie v tuto chvíli nevíme, zda se jedná o efekt dlouhodobé stimulace anebo o bazálně nízkou expresi po aktivaci.

Z našich dat vyplývá, že by mohly mít námi kultivované iNKT buňky, jak schopnost modulovat imunitní buňky (zastoupení CD4+ buněk), tak schopnost cytotoxické aktivity (CD8+, DN buňky). Přestože iNKT buňky ovlivňují protinádorové reakce nepřímo sekretováním cytokinů a podporou cytolytických funkcí T a NK buněk, bylo vědeckou prací od Bassiri, Das a Nichols, 2013 také potvrzeno, že iNKT buňky zprostředkovávají přímou antitumorální aktivitu *in vitro* a významně inhibují růst nádoru *in vivo*, dokonce i v nepřítomnosti dalších cytotoxických lymfocytů (Bassiri, Das a Nichols, 2013). Na základě vyhodnocení výsledků cytotoxických testů bylo zjištěno, že nádorové linie RAJI, KG1a a H929 jsou proti přirozené cytotoxické funkci iNKT buněk spíše rezistentní a je potřeba tyto buňky více stimulovat. Všechny tyto linie jsou primárně negativní na CD1d molekulu, takže nejsou schopny předkládat antigen pro iTCR. Proto je pravděpodobně třeba buňky

senzibilizovat například pomocí kyseliny all trans retinové (ATRA), která má schopnost CD1d molekulu u B-lymfocytů a hlavně u myelomových buněk zvyšovat (Rotolo *et al.*, 2018). Také u chronické lymfoidní leukemie (CLL) se prokázal vliv zvýšení exprese CD1d molekuly a senzitivity CLL buněk na cytotoxickou aktivitu iNKT (Ghnewa *et al.*, 2017).

Nejzajímavější výsledky byly zjištěny u linie K562, kde byl detekován výrazný cytotoxický efekt hlavně v poměru 1 : 20 (nádorové buňky : iNKT). Tato linie sice taktéž nemá CD1d molekulu, ale naproti tomu má vysokou expresi ligandů pro NKG2D (Bae, Hwang a Lee, 2012), a tím je schopná aktivovat iNKT buňky CD1d nezávislou cestou (Kuylenstierna *et al.*, 2011).

Vedle cytotoxické funkce mají iNKT buňky také schopnost modulovat ostatní buňky imunitního systému. Tyto modulace jsme testovali pomocí ko-kultivace iNKT buněk a autologních nespecificky stimulovaných mononukleárních buněk. Nespecifická stimulace zvýšila expresi aktivačních markerů CD25 a HLA-DR u všech dárců. Přidání iNKT buněk primárně nesnížilo zastoupení CD25 a HLA-DR pozitivních buněk, jako tomu bývá například u experimentů využívající k imunomodulaci mesenchymální kmenové buňky (Holubova *et al.*, 2014), ale spíše snížilo aktivační status buněk tím, že poklesla exprese znaků na pozitivních buňkách. Nejvyšší efekt byl zaznamenán po 48 hod. od přidání iNKT buněk, kde byla v poměru 1 : 2 (MNC : iNKT) detekována snížená exprese jak CD25, tak HLA-DR, který byl snížen i u poměru 1:1. Ovlivnění (snížení) exprese aktivačních znaků T-lymfocytů bylo prokázáno v podobné studii, kde však byla imunomodulace značně vyšší, což by opět mohlo souviset s reaktivací buněk (Schmid *et al.*, 2018). V této studii bylo zároveň prokázáno zpomalení proliferace odpovídající i našim výsledkům, kde jsme pomocí detekce intenzity CFSE zjistily menší proliferační potenciál u aktivovaných MNC s přidáním iNKT buněk, než tomu bylo u kontroly.

6 Závěr

Z výsledků této práce vyplývá, že invariantní NKT buňky jsou variabilní populace. Tyto buňky mají heterogenní imunofenotyp, cytotoxický a imunomodulační potenciál. Naše hypotéza byla potvrzena.

Všechny cíle této práce byly splněny. Byly detekovány rozdíly v chování invariantních NKT buněk mezi jednotlivými zdravými jedinci. Byly úspěšně izolovány iNKT buňky zdravých dárců z mononukleárních buněk s následnou *in vitro* expanzí. Optimální expanze bylo dosaženo díky specifické aktivaci pomocí interakcí α -GalCer a CD1d molekuly a díky optimálně zvoleným podmínkám kultivace. Byly detekovány značné rozdíly v růstových vlastnostech buněk, i přes to byla získána populace iNKT buněk s vysokou čistotou u všech jedinců. Velká heterogenita byla zaznamenána u imunofenotypu iNKT buněk. Byly detekovány základní subpopulace iNKT buněk a to CD4+, CD8+ subpopulace a dvojitě negativní buňky. U iNKT buněk a jejich subpopulací byla naměřena značná variabilita exprese následujících funkčních molekul po expanzi *in vitro*: aktivačního receptoru NKG2D, CD25 – receptoru IL-2 a membránového glykoproteinu CD62L. Dle očekávání bylo stanoveno většinové zastoupení paměťových (CD45RO) iNKT buněk a malé množství naivních buněk (CD45RA) iNKT buněk. Z našich výsledků vyplývá, že by iNKT buňky mohly mít schopnost modulovat další buňky imunitního systému. V těchto pokusech byla potvrzena zvýšená exprese aktivačních markerů CD25 a HLA-DR po ko-kultivaci iNKT buněk s autologními nespecificky stimulovanými mononukleárními buňkami. Dále byla zaznamenána také schopnost cytotoxické aktivity těchto buněk, například proti nádorové buněčné linii K562, čímž byl potvrzen další cíl práce.

V dalším studiu plánuji pokračovat v laboratorních pokusech týkajících se invariantních NKT buněk a jejich zásadních vlastností a funkcí, a tím rozšířit poznatky získané v této diplomové práci.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň – FNPI, 00669806).

7 Seznam použitých zkratk

7-AAD	7-aminoactinomycin D
AHR	hyperreaktivita dýchacích cest
APC	antigen prezentující buňka
ATB	antibiotika
ATRA	kyselina all trans retinová
CD	cluster of differentiation
CD62L	L-selektin
CFSE	6-carboxyfluorescein succinimidyl ester
cGvHD	chronická reakce štěpu proti hostiteli
CLL	chronická lymfatická leukemie
CO ₂	oxid uhličitý
DMSO	dimethylsulfoxid
DN	double negative, dvojitě negativní buňky
FBS	fetal bovine serum; fetální bovinní sérum
FT1	flow through 1
FT2	flow through 2
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
GVT	graft versus tumor effect, reakce štěpu proti nádoru
Gy	Gray
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IFN γ	interferon gamma
IL-15, IL-3, 4, 9, 10, 17, 25	interleukin 15, interleukin 3, 4, 9, 10, 17, 25

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNKT	invariantní NK T-lymfocyty, invariantní NKT buňky
MNC	mononukleární buňky
MTOC	centrum organizující mikrotubuly
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový fyziologický roztok
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
TCR	T buněčný receptor
TGF- β	transforming growth factor β
Th	pomocné T-lymfocyty
TME	mikroprostředí nádoru
TNF- α	tumor necrosis factor
T-reg	regulační T-lymfocyt
α -GalCer	α -Galactosylceramid

8 Seznam použité literatury

- Adams, E. J. a Luoma, A. M. (2012) „The yin and yang of CD1d recognition", *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 13(9), s. 814–815. doi: 10.1038/ni.2401.
- Akbari, O. *et al.* (2003) „Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity", *Nature Medicine*, 9(5), s. 582–588. doi: 10.1038/nm851.
- Anděl, M., Gregor P., Horák J. (2001) "Vnitřní lékařství", Praha: Karolinum, Scripta. s. 27-30 ISBN 80-7262-085-1.
- Ashkar, A. A. a Rosenthal, K. L. (2003) „Interleukin-15 and Natural Killer and NKT Cells Play a Critical Role in Innate Protection against Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection", *Journal of Virology*, 77(18), s. 10168–10171. doi: 10.1128/jvi.77.18.10168-10171.2003.
- Bae, D. S., Hwang, Y. K. a Lee, J. K. (2012) „Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell", *Cellular Immunology*. Elsevier Inc., 276(1–2), s. 122–127. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.04.011.
- Bassiri, H., Das, R. a Nichols, K. E. (2013) „Invariant NKT cells: Killers and conspirators against cancer", *OncoImmunology*, 2(12). doi: 10.4161/onci.27440.
- Beare, A. *et al.* (2008) „The CD system of leukocyte surface molecules", *Wiley Interscience*, (February). doi: 10.1002/0471142735.ima04as80.
- Bendelac, A., Savage, P. B. a Teyton, L. (2007) „The Biology of NKT Cells", *Annual Review of Immunology*, 25(1), s. 297–336. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- Bennstein, S. B. (2018) „Unraveling natural killer T-cells development", *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). doi: 10.3389/fimmu.2017.01950.
- Bohnenkamp, H., Hilbert, U. a Noll, T. (2002) „Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale", *Cytotechnology*, 38(1–3), s. 135–145. doi: 10.1023/A:1021174619613.
- Booth, N. J. *et al.* (2010) „Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4 + Regulatory T Cells That Express either CD45RA or CD45RO ", *The Journal of Immunology*, 184(8), s. 4317–4326. doi: 10.4049/jimmunol.0903781.

- Brutkiewicz, R. R. (2006) „CD1d Ligands: The Good, the Bad, and the Ugly", *The Journal of Immunology*, 177(2), s. 769–775. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.769.
- Campos-Martín, Y. *et al.* (2006) „Immature Human Dendritic Cells Infected with *Leishmania infantum* Are Resistant to NK-Mediated Cytolysis but Are Efficiently Recognized by NKT Cells ", *The Journal of Immunology*, 176(10), s. 6172–6179. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6172.
- Chaidos, A. *et al.* (2012) „Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", *Blood*, 119(21), s. 5030–5036. doi: 10.1182/blood-2011-11-389304.
- Chang, W.-S. *et al.* (2008) „Cutting Edge: Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 Interaction Regulates the Induction and Maintenance of Invariant NKT Cell Anergy", *The Journal of Immunology*, 181(10), s. 6707–6710. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6707.
- Chang, Y. *et al.* (2011) „Influenza infection in suckling mice expands an NKT cell subset that protects against airway hyperreactivity", *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), s. 57–69. doi: 10.1172/JCI44845DS1.
- Chen, Q. a Ross, A. C. (2015) „All-trans-retinoic acid and CD38 ligation differentially regulate CD1d expression and α -galactosylceramide-induced immune responses", *Immunobiology*. Elsevier GmbH., 220(1), s. 32–41. doi: 10.1016/j.imbio.2014.09.008.
- Chinen, T. *et al.* (2016) „An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function", *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 17(11), s. 1322–1333. doi: 10.1038/ni.3540.
- Cianferoni, A. (2013) „Invariant Natural Killer T Cells", *Antibodies*, 3(1), s. 16–36. doi: 10.3390/antib3010016.
- D'Andréa, A. *et al.* (2000) „Neonatal invariant V α 24⁺ NKT lymphocytes are activated memory cells", *European Journal of Immunology*, 30(6), s. 1544–1550. doi: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1544::AID-IMMU1544>3.0.CO;2-I.
- Doherty, D. G. *et al.* (2018) „Activation and regulation of B cell responses by invariant natural killer T cells", *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), s. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2018.01360.
- Drees, C. *et al.* (2017) „Roquin Paralogs Differentially Regulate Functional NKT Cell Subsets", *The Journal of Immunology*, 198(7), s. 2747–2759. doi: 10.4049/jimmunol.1601732.

- Du, J. *et al.* (2017) „Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells", *Blood*, 129(23), s. 3121–3125. doi: 10.1182/blood-2016-11-752444.
- Duthie, M. S. *et al.* (2002) „During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphosphoinositol-modified surface protein", *Infection and Immunity*, 70(1), s. 36–48. doi: 10.1128/IAI.70.1.36-48.2002.
- Engel, P. *et al.* (2015) „CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology", *The Journal of Immunology*, 195(10), s. 4555–4563. doi: 10.4049/jimmunol.1502033.
- Gapin, L. (2017) „Development of invariant natural killer T cells Laurent", *Physiology & behavior*, 176(3), s. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Ghnewa, Y. G. *et al.* (2017) „Retinoic acid induction of CD1d expression primes chronic lymphocytic leukemia B cells for killing by CD8+ invariant natural killer T cells", *Clinical Immunology*. Elsevier Inc, 183, s. 91–98. doi: 10.1016/j.clim.2017.08.002.
- Gregory S. Travlos (2006) „Normal Structure , Function , and Histology of the Bone Marrow", *Toxicologic Pathology*, s. 548–565. doi: 10.1080/01926230600939856.
- Hedfors, I. A. a Brinchmann, J. E. (2003) „Long-Term Proliferation and Survival of In Vitro-Activated T Cells is Dependent on Interleukin-2 Receptor Signalling but not on the High-Affinity IL-2R", *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(5), s. 522–532. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01338.x.
- Holubova, M. *et al.* (2014) „Expanded cryopreserved mesenchymal stromal cells as an optimal source for graft-versus-host disease treatment", *Biologicals*. Elsevier Ltd, 42(3), s. 139–144. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.01.003.
- Jagannathan-Bogdan, M. a Zon, L. I. (2013) „Hematopoiesis", *Development*, 140(12), s. 2463–7. doi: 10.1242/dev.083147.
- Jiang, Z. M. *et al.* (2015) „Development of genetically engineered iNKT cells expressing TCRs specific for the M. tuberculosis 38-kDa antigen", *Journal of Translational Medicine*, 13(1), s. 1–10. doi: 10.1186/s12967-015-0502-4.

- Juno, J. A., Keynan, Y. a Fowke, K. R. (2012) „Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection", *PLoS Pathogens*, 8(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1002838.
- Van Kaer, L. a Wu, L. (2018) „Therapeutic potential of invariant natural killer T cells in autoimmunity", *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), s. 1–7. doi: 10.3389/fimmu.2018.00519.
- Kaneko, Y. *et al.* (2000) „Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis", *Journal of Experimental Medicine*, 191(1), s. 105–114. doi: 10.1084/jem.191.1.105.
- Keohane E. M. a Smith L. J. Smith (2016) „Rodak's Hematology - Clinical Principles and Application", s. 65-95 ISBN: 9780323239066.
- Kim, J. O. *et al.* (2004) „Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), s. 1332–1338. doi: 10.1016/j.jaci.2004.09.004.
- King, L. A. *et al.* (2018) „CD1d-Invariant Natural Killer T Cell-Based Cancer Immunotherapy: α -Galactosylceramide and Beyond", *Frontiers in Immunology*, 9(July). doi: 10.3389/fimmu.2018.01519.
- Kumar, S., Lu, T. a Schwartz-albiez, R. (2012) „GlycoCD: a repository for carbohydrate-related CD antigens", *Bioinformatics*, 28(19), s. 2553–2555. doi: 10.1093/bioinformatics/bts481.
- Kuylenskierna, C. *et al.* (2011) „NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity, and co-stimulation of activation by CD1d", *Eur J Immunol.*, 41(7), s. 1913–1923. doi: 10.1002/eji.200940278.NKG2D.
- Lewis L. Lanier (2017) „NKG2D receptor and its ligands in host defense Lewis", *Physiology & behavior*, 176(5), s. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Lynch, L. *et al.* (2015) „Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T reg cells and macrophages in adipose tissue", *Nature Immunology*, 16(1), s. 85–95. doi: 10.1038/ni.3047.
- Magalhaes, I., Kiaf, B. a Lehuen, A. (2015) „iNKT and MAIT cell alterations in diabetes", *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), s. 6–12. doi: 10.3389/fimmu.2015.00341.

- Matsuda, J. L. *et al.* (2008) „CD1d-restricted iNKT cells, the ‚Swiss-Army knife‘ of the immune system", *Current Opinion in Immunology*, 20(3), s. 358–368. doi: 10.1016/j.coi.2008.03.018.
- Mavers, M., Maas-Bauer, K. a Negrin, R. S. (2017) „Invariant natural killer T cells as suppressors of graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", *Frontiers in Immunology*, 8(JUL), s. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2017.00900.
- McCarthy, C. *et al.* (2007) „The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation", *Journal of Experimental Medicine*, 204(5), s. 1131–1144. doi: 10.1084/jem.20062342.
- Meyer, E. H. *et al.* (2006) „Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), s. 2782–2787. doi: 10.1073/pnas.0510282103.
- Montoya, C. J. *et al.* (2007) „Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11", *Immunology*, 122(1), s. 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02647.x.
- Moody, D. B., Zajonc, D. M. a Wilson, I. A. (2005) „Anatomy of CD1-lipid antigen complexes", *Nature Reviews Immunology*, 5(5), s. 387–399. doi: 10.1038/nri1605.
- Motohashi, S. *et al.* (2006) „A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer", *Clinical Cancer Research*, 12(20 PART 1), s. 6079–6086. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0114.
- Nagato, K. *et al.* (2012) „Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells", *Journal of Clinical Immunology*, 32(5), s. 1071–1081. doi: 10.1007/s10875-012-9697-9.
- Nencioni, A. *et al.* (2008) „The use of dendritic cells in cancer immunotherapy", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 65(3), s. 191–199. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.10.002.
- Nguyen, K. D., Vanichsarn, C. a Nadeau, K. C. (2008) „Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in allergic asthma", *European Journal of Immunology*, 38(7), s. 2034–2045. doi: 10.1002/eji.200738082.

- Palucka, K. a Banchereau, J. (2013) „Dendritic cell-based cancer therapeutic vaccines Karolina", *Immunity*, 39(1), s. 38–48. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.004.Dendritic.
- Pellicci, D. G. *et al.* (2015) „Differential recognition of CD1d- α -galactosyl ceramide by the V β 8.2 and V β 7 semi-invariant NKT T-cell receptors", *Journal of Investigative Dermatology*, 135(2), s. 612–615. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Peralbo, E. *et al.* (2006) „Decreased frequency and proliferative response of invariant V α 24V β 11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly", *Biogerontology*, 7(5–6), s. 483–492. doi: 10.1007/s10522-006-9063-5.
- Porcelli, S. A. (1995) „The CD1 Family: A Third lineage of Antigen- Presenting Molecules", *Advances in immunology*, 59.
- Porcelli, S. A. *et al.* (1998) „The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules", *Immunology Today*, 19(8), s. 362–368. doi: 10.1016/S0167-5699(98)01289-4.
- Prajapati, K. *et al.* (2018) „Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy", *Cellular and Molecular Immunology*, 15(5), s. 470–479. doi: 10.1038/cmi.2017.161.
- Rotolo, A. *et al.* (2018) „Enhanced Anti-lymphoma Activity of CAR19-iNKT Cells Underpinned by Dual CD19 and CD1d Targeting", *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 34(4), s. 596–610.e11. doi: 10.1016/j.ccell.2018.08.017.
- Rubio, M. T. *et al.* (2012) „Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival", *Blood*, 120(10), s. 2144–2154. doi: 10.1182/blood-2012-01-404673.
- van Schaik, B. *et al.* (2008) „Discovery of invariant T cells by next generation sequencing of the human T cell receptor α chain repertoire", *Bone*, 23(1), s. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Schmid, H. *et al.* (2018) „Culture-expanded human invariant natural killer T cells suppress T-cell alloreactivity and eradicate leukemia", *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), s. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.01817.
- Schneidawind, D. *et al.* (2014) „CD41 invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD41CD251FoxP31 regulatory T cells", *Blood*, 124(22), s. 3320–3328. doi: 10.1182/blood-2014-05-576017.

- Shissler, S. C. a Webb, T. J. (2019) „The ins and outs of type I iNKT cell development", *Molecular Immunology*. Elsevier, 105(September 2018), s. 116–130. doi: 10.1016/j.molimm.2018.09.023.
- Simoni, Y. *et al.* (2013) „Therapeutic manipulation of natural killer (NK)T cells in autoimmunity: Are we close to reality?", *Clinical and Experimental Immunology*, 171(1), s. 8–19. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04625.x.
- Song, L. *et al.* (2009) „V α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages", *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), s. 1524–1536. doi: 10.1172/JCI37869.
- Stríž, Ilja a Vladimír Holář. (2015) "Cytokiny v klinické medicíně" Praha: Maxdorf, Jessenius. s. 15-22. ISBN 978-80-7345-427-2.
- Tachibana, T. *et al.* (2005) „Increased intratumor V α 24-positive natural killer T cells: A prognostic factor for primary colorectal carcinomas", *Clinical Cancer Research*, 11(20), s. 7322–7327. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0877.
- Tian, G. *et al.* (2016) „CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo", *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), s. 2341–2355. doi: 10.1172/JCI83476.
- Tupin, E. *et al.* (2004) „CD1d-dependent Activation of NKT Cells Aggravates Atherosclerosis", *Journal of Experimental Medicine*, 199(3), s. 417–422. doi: 10.1084/jem.20030997.
- Uppal, S. S., Verma, S. a Dhot, P. S. (2003) „Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking", *Cytometry*, 52B(1), s. 32–36. doi: 10.1002/cyto.b.10011.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. a Trapani, J. A. (2015) „Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology", *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(6), s. 388–400. doi: 10.1038/nri3839.
- Wang, H. a Hogquist, K. A. (2018) „How lipid-specific T cells become effectors: The differentiation of iNKT subsets", *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). doi: 10.3389/fimmu.2018.01450.

- Wolf, B. J., Choi, J. E. a Exley, M. A. (2018) „Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy", *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). doi: 10.3389/fimmu.2018.00384.
- Woods, N. *et al.* (2016) *Natural Vaccine Adjuvants and Immunopotentiators Derived From Plants, Fungi, Marine Organisms, and Insects, Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-804019-5.00011-6.
- Wu, D. *et al.* (2005) „Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), s. 1351–1356. doi: 10.1073/pnas.0408696102.
- Ye, Z. *et al.* (2017) „L-selectin promotes the maturation of dendritic cells via up-regulation the expression of TLR4 in vitro", *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 47(4), s. 389–394.
- Zeng, S. G. *et al.* (2013) „Human Invariant NKT Cell Subsets Differentially Promote Differentiation, Antibody Production, and T Cell Stimulation by B Cells In Vitro", *The Journal of Immunology*, 191(4), s. 1666–1676. doi: 10.4049/jimmunol.1202223.
- Zhang, Y. *et al.* (2019) „ α -GalCer and iNKT cell-based cancer immunotherapy: Realizing the therapeutic potentials", *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), s. 11–15. doi: 10.3389/fimmu.2019.01126.
- Zheng, X. *et al.* (2008) „Modulation of NKT cell development by B7-CD28 interaction: An expanding horizon for costimulation", *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002703.
- Zola, H. *et al.* (2007) „CD molecules 2006 - Human cell differentiation molecules", *Journal of Immunological Methods*, 319(1–2), s. 1–5. doi: 10.1016/j.jim.2006.11.001.

PŘÍLOHY

Seznam

Imunofenotyp (strana II)

Příloha 1 – Primární data data imunofenotypu

Cytotoxické testy (strana III – IV)

Příloha 2 - RAJI

Příloha 3 – H929

Příloha 4 – K562

Příloha 5 – KG1a

Imunomodulační testy

Příloha 6 (strana V – VI) – zastoupení CD25 pozitivních buněk

Příloha 7 (strana VII – VIII) – CD25 intenzita

Příloha 8 (strana IX – X) – zastoupení HLA–DR pozitivních buněk

Příloha 9 (strana XI – XII) – HLA–DR intenzita

Příloha 10 (strana XIII – XIV) – CFSE intenzita



* výsledky vykazují statisticky signifikantní rozdíly oproti kontrole

Vysvětlivky k následujícím grafům.

Příloha 1 – primární data stanovení imunofenotypu

Tab. I: Primární data procentuálního zastoupení jednotlivých subpopulací iNKT buněk.

	iNKT							
	CD4+	CD8+	CD4-CD8-	NKG2D	CD25	CD62L	Memory	Naive
i1	6,81	59,3	28,3	81,6	2,25	6,02	94,5	0,1000
i2	21	22,4	51,5	39	8,6	5,87	97,2	0,0092
i3	76,2	4,2	16,9	21	3	6,4	93,5	0,0830
i4	3,55	11,8	83,2	93,8	5,92	2,82	99	0,0093
i5	56,7	15,6	25,8	41,6	2,83	0,87	98,1	0,0560
i6	20,9	19,2	57,7	70	4,93	1,23	97,2	0,0087
i7	0,85	60,5	38,3	96,1	5,09	4,62	97	0,0000
i8	14,1	53	23,1	82,4	1,58	14,3	67	7,2100
i9	43,8	21,5	31	42,2	7,76	9,25	99	0,0085
i10	60,6	0,57	34	13,9	24,8	23,1	97,2	0,0520

Tab. II: Primární data procentuálního zastoupení jednotlivých znaků u CD4+ a CD8+ subpopulací a u dvojitě negativních iNKT buněk.

	CD4+			CD8+			Dvojitě negativní		
	NKG2D	CD25	CD62L	NKG2D	CD25	CD62L	NKG2D	CD25	CD62L
i1	21,4	10,2	47,6	92,4	1,08	2,93	84,2	2,16	12
i2	10,5	6,62	11,6	61,7	9,05	1,68	44,4	16,8	15,3
i3	2,21	2,73	5,68	77,8	6,83	6,83	86,8	8,91	18,5
i4	58,2	10,5	8,68	97,9	4,98	0,55	97,1	7,21	9,11
i5	4,43	2,84	0,66	89,1	1,98	0,6	93,7	1,89	7,21
i6	24,5	2,03	1,12	96	1,9	0,72	85,1	3,07	7,09
i7	74,2	14	11,8	98	2,83	3,17	97,8	6,46	11,9
i8	5,91	2,04	15,3	98,1	0,17	11	93,9	0,66	20,9
i9	3,75	6,31	12,7	95,3	8,57	5,88	62,2	6,09	12,6
i10	4,08	17,5	21,8	76,9	4,62	4,62	34,1	25,1	35,3

Příloha 2 – Primární data pro cytotoxické testy – nádorová linie RAJI po 24 a 48 hod.

Tab. III: Primární data znázorňující procentuální zastoupení mrtvých nádorových buněk nádorové buněčné linie RAJI po 24 a 48 hod.

	24 h						48 h					
	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20
i1	4,15	8,78	13,6	15,7	9,26	18,2	3,48	5,05	6,23	7,03	10,7	5,5
i2		6,83	7,59	11,3	10,2	19,6		38,5	15,6	24,2	9,09	9,3
i3		15,9	14,3	16	25,3	31,2		9,79	11,9	8,32	7,67	6,71
i4		22,8	24,4	20,6	24,8	16,5		11,1	8,91	6,34	6,29	5,74
i5	4,3	32,8	16,3	16,5	16,2	10,8	3,62	5,03	16,9	5,5	2,3	4,54
i6		15,2	17,4	9,73	15,6	12,9		10,2	4,42	6,49	4,59	9,12
i7		14,8	9,15	7,88	10,6	3,44		12,7	8,92	4,7	6,14	3,88
i8	4,22	14,3	12,2	32	21,3	15,1	5,84	15,2	9,62	10,6	7,42	14,1
i9		19,6	14,4	17,1	20,2	22,2		45,9	71,4	46,3	18,4	25,2
i10		52,3	11,7	10,2	13,7	11,5		13,7	9,18	10,8	8,2	5,14

Příloha 3 – Primární data pro cytotoxické testy – nádorová linie H929 po 24 a 48 hod.

Tab. IV: Primární data znázorňující procentuální zastoupení mrtvých nádorových buněk nádorové buněčné linie H929 po 24 a 48 hod.

	24 h						48 h					
	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20
i1	27,4	37,1	43,4	33,9	45,2	34,5	20,3	38,2	39,6	32,8	41,4	46,8
i2		40,9	46,4	48,8	39,5	41		71,6	46,7	49,5	43,2	42,2
i3		45,1	43,8	45,9	49,8	38,6		36,8	50,7	40,8	46,7	47,9
i4		36,1	38,6	44,8	61,6	33,4		62,6	41,3	38,1	34,5	37
i5	40,7	41	37,9	39,5	42,8	50,4	50,1	48,9	52,4	80,2	42,8	50
i6		40,8	37,3	32,7	36,6	34,6		50,1	45,8	46	44,9	36,2
i7		36	41,6	49	37,8	37,1		44,5	53,8	43,4	52,1	45,6
i8	35,1	69,9	78,3	31,1	32,2	41	73	89,4	45,6	39,6	43,3	48,9
i9		36,6	39,8	54,7	64,2	50,5		52	42,7	56,7	52,7	69,7
i10		68,2	45,5	34,5	43,3	61,6		49,3	60,4	51,9	59,4	72,8

Příloha 4 – Primární data pro cytotoxické testy – nádorová linie K562 po 24 a 48 hod.

Tab. V: Primární data znázorňující procentuální zastoupení mrtvých nádorových buněk nádorové buněčné linie K562 po 24 a 48 hod.

	24 h						48 h					
	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20
i1	4,62	14,1	15,5	17,8	34,1	39,3	3,16	5,09	4,94	9,73	14,1	25,3
i2		54,8	12,9	25,8	44,9	79,3		5,42	19,7	13,6	33,5	68,9
i3		14,3	13,7	10,8	23,6	8,58		5,43	34,3	10,5	10,7	7,69
i4		54,6	40,4	57,7	60,3	67,2		6,88	19,9	35,6	61,2	74,6
i5	8,05	18,3	20,6	31,3	65,7	77,2	3,73	32,6	9	28,6	45,1	82,5
i6		39,7	22,6	24,5	49,3	34,5		19,6	31,9	27,6	9,78	10,8
i7		14,5	18,2	20,4	19,1	13,2		8,43	7,05	15	10,1	8,09
i8	7,16	52,3	12,9	29,2	20,7	17,5	6,93	8,59	7,97	11,1	6,92	9,08
i9		17,3	53,2	46	38,7	78,8		20,8	38,7	13,2	20,7	83
i10		14,9	19,2	16,3	23,6	29,9		22,9	9,32	15,3	12,2	18,9

Příloha 5 - Primární data pro cytotoxické testy – nádorová linie KG1a po 24 a 48 hod.

Tab. VI: Primární data znázorňující procentuální zastoupení mrtvých nádorových buněk nádorové buněčné linie KG1a po 24 a 48 hod.

	24 h						48 h					
	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20	CTRL	1 : 0,5	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 20
i1	12	4,3	10,6	7,18	8,65	20,9	17,6	35,1	19,3	22,8	17,5	18
i2		20,4	6,36	15,9	13,3	12,4		35,6	28,2	44	47,4	24,7
i3		13,9	9,64	12,5	15,5	6,96		32,8	27,3	25,3	30,7	23,3
i4		21,9	12,7	21	28,3	12,1		38,6	28,1	38,6	58,8	31,7
i5	8,52	17,7	13,5	31,2	25,6	33,8	13,7	37,1	29,8	27,6	17,9	44,8
i6		17,6	13,2	22	29,4	27,5		40,3	46,6	41,3	32	28,6
i7		17,6	20,9	17,8	29	23,9		25,1	18,5	36,3	25,1	24
i8	19,1	17,1	21,5	18,3	16,4	19,1	28,1	46,6	44,7	42,7	48,7	40,7
i9		10,7	19,7	26,1	20,4	28,1		42,4	22,1	30,4	27,5	33,7
i10		17,3	9,77	21,1	22,1	43,4		26,4	38,9	33,4	38,6	23,8

Příloha 6 – zastoupení CD25 pozitivních buněk – imunomodulační test

Tab. VII: Vyhodnocení dat zastoupení CD25 pozitivních buněk po normalizaci, kde byla kontrola určena jako 100 % a u jednotlivých vzorků se sledoval procentuální nárůst či pokles exprese.

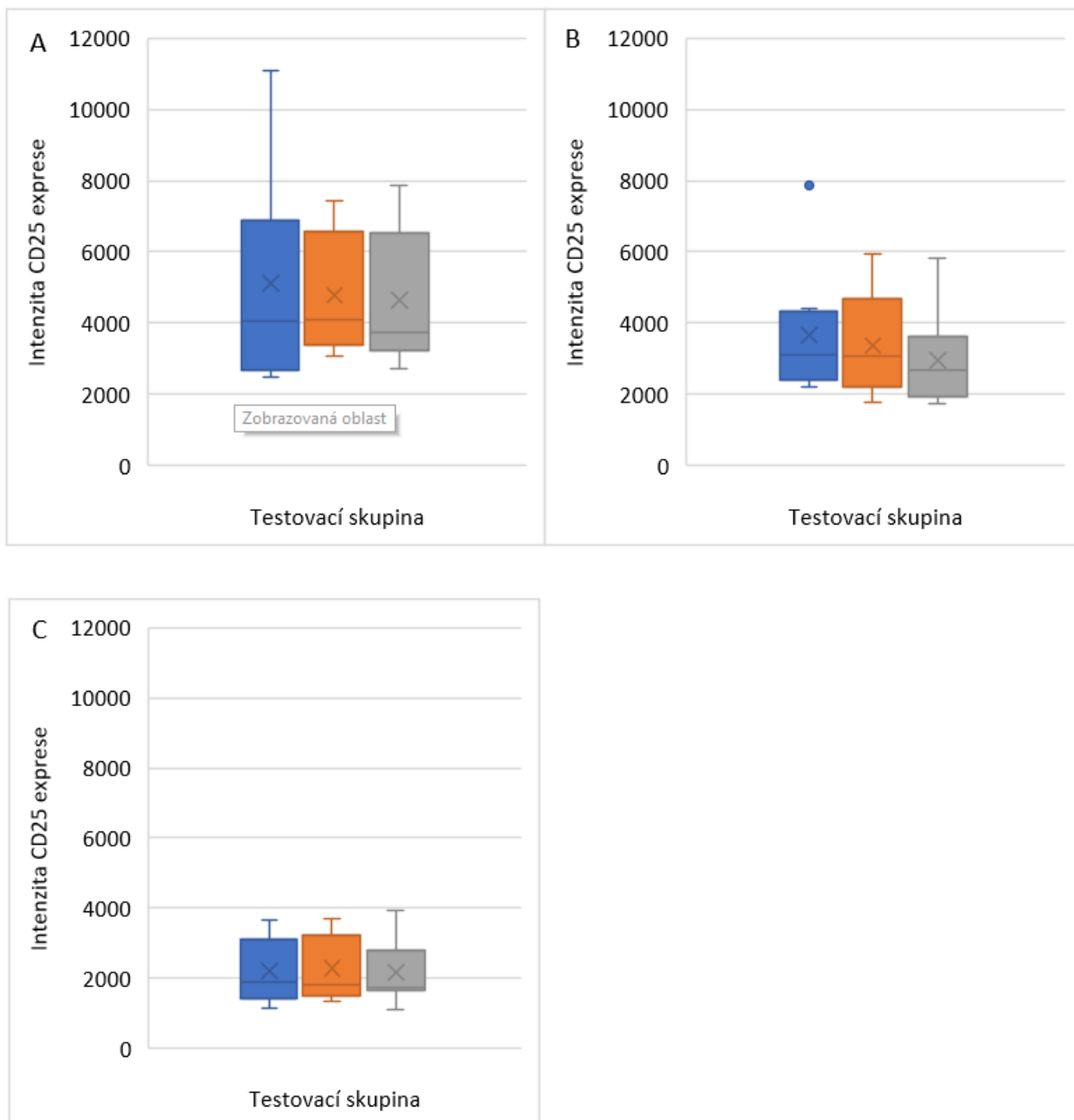
24			48			72		
CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
100	100,4306	98,27772	100	97,40699	96,39233	100	103,5065	101,4286
100	102,2272	100,6682	100	99,78355	98,37662	100		97,24138
100	107,6835	106,1927	100	95,63319	98,36245	100	100,8772	104,7619
100	100,7667	100,3286	100	102,0948	100,441	100	98,25328	95,63319
100	101,2973	101,7297	100	101,5234	100,7617	100	104,4571	99,2
100	99,46638	99,78655	100	98,15217	98,91304	100	85,73186	95,07995
100	96,90502	98,07898	100	105,3613	96,15385	100	130,0477	130,2067
100	101,2141	99,00662	100	98,31271	94,3757	100	100,5789	110,9986
100	89,0411	100,5269	100	99,47146	99,78858	100	93,8914	102,4887
100	100,5637	104,3968	100	95,37445	100,8811	100	103,5227	96,70455

Tab. VIII: Primární data procentuálního zastoupení CD25 pozitivních buněk.

	24			48			72		
	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
i1	92,9	93,3	91,3	88,7	86,4	85,5	77	79,7	78,1
i2	89,8	91,8	90,4	92,4	92,2	90,9	87		84,6
i3	87,2	93,9	92,6	91,6	87,6	90,1	79,8	80,5	83,6
i4	91,3	92	91,6	90,7	92,6	91,1	91,6	90	87,6
i5	92,5	93,7	94,1	91,9	93,3	92,6	87,5	91,4	86,8
i6	93,7	93,2	93,5	92	90,3	91	81,3	69,7	77,3
i7	93,7	90,8	91,9	85,8	90,4	82,5	62,9	81,8	81,9
i8	90,6	91,7	89,7	88,9	87,4	83,9	69,1	69,5	76,7
i9	94,9	84,5	95,4	94,6	94,1	94,4	88,4	83	90,6
i10	88,7	89,2	92,6	90,8	86,6	91,6	88	91,1	85,1

Obr. 1: Množství CD25 pozitivních MNC buněk, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Grafy vycházejí z primárních dat.

■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



Příloha 7 – intenzita CD25 – imunomodulační test

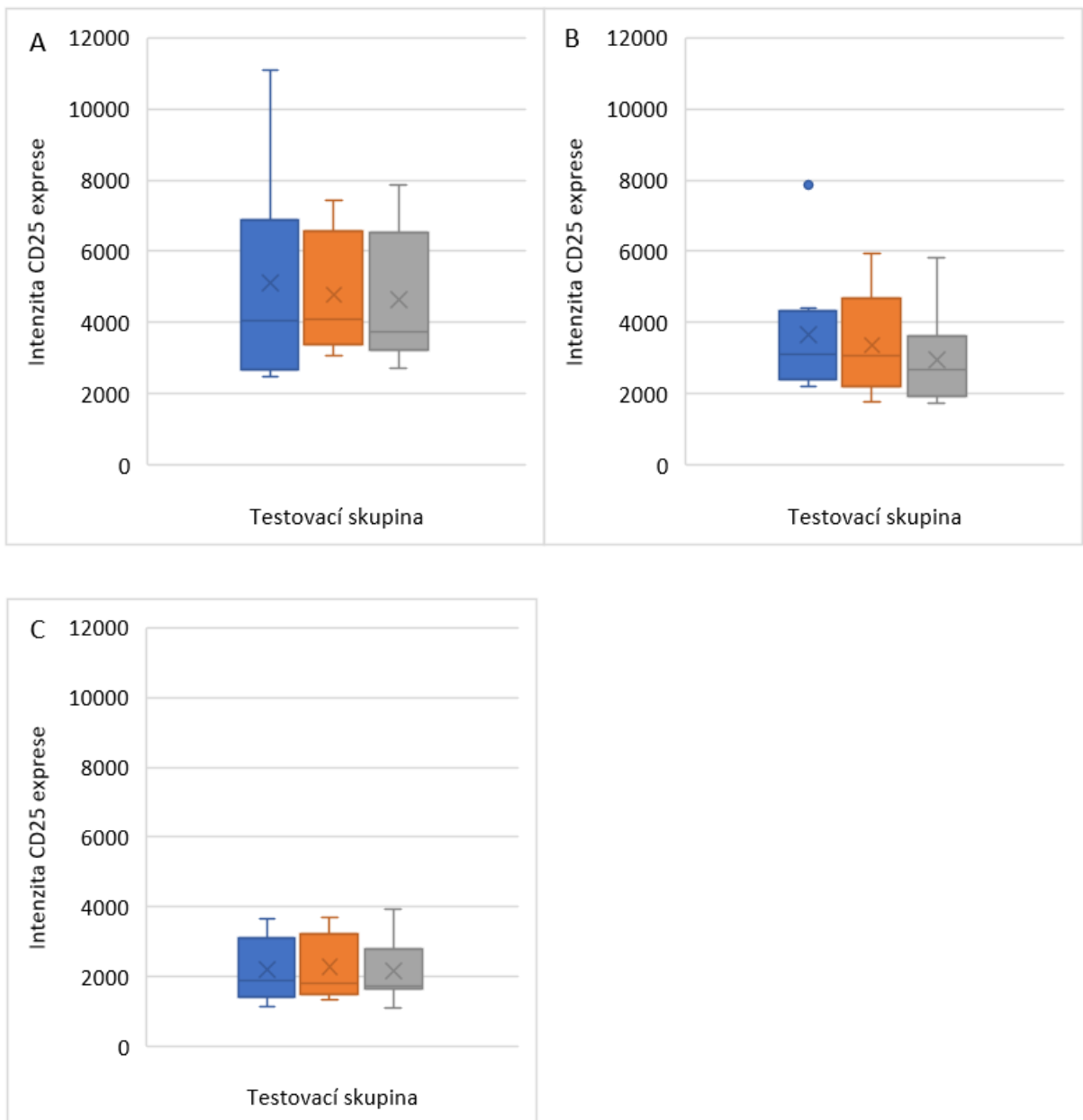
Tab. IX: Vyhodnocení dat intenzity exprese CD25 po normalizaci, kde byla kontrola určena jako 100 % a u jednotlivých vzorků se sledoval procentuální nárůst či pokles exprese.

24			48			72		
CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
100	101,9671	96,14659	100	73,92947	88,95886	100	120,1456	89,32039
100	107,1608	96,03399	100	81,22044	65,94134	100		82,56507
100	165,1259	139,9098	100	100,5928	78,65937	100	108,8874	112,3766
100	67,03098	70,32788	100	108,4438	103,5822	100	105,0146	105,0146
100	87,97234	75,46229	100	108,7036	75,62087	100	110,4478	81,46477
100	75,80792	85,70778	100	75,04298	73,29513	100	79,37352	96,92671
100	106,931	84,57696	100	112,6869	73,74473	100	161,1454	156,8282
100	123,9261	116,2184	100	88,44884	79,99175	100	100,6085	111,6295
100	76,47615	93,05621	100	75,45848	74,17219	100	100,2175	106,741
100	136,0705	125,1969	100	115,2813	107,9855	100	125,6981	80,59631

Tab. X: Primární data intenzity exprese CD25.

	24			48			72		
	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
i1	3711	3784	3568	2382	1761	2119	1236	1485	1104
i2	6354	6809	6102	4228	3434	2788	3189		2633
i3	2661	4394	3723	2193	2206	1725	1519	1654	1707
i4	11071	7421	7786	4299	4662	4453	3091	3246	3246
i5	6219	5471	4693	4389	4771	3319	2881	3182	2347
i6	4394	3331	3766	3490	2619	2558	1692	1343	1640
i7	3203	3425	2709	2609	2940	1924	1135	1829	1780
i8	2491	3087	2895	2424	2144	1939	1479	1488	1651
i9	8468	6476	7880	7852	5925	5824	3679	3687	3927
i10	2667	3629	3339	2755	3176	2975	2113	2656	1703

Obr. 2: Intenzita exprese CD25, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Grafy vycházejí z primárních dat. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



Příloha 8 – zastoupení HLA-DR pozitivních buněk – imunomodulační test

Tab. XI: Vyhodnocení dat zastoupení HLA-DR pozitivních buněk po normalizaci, kde byla kontrola určena jako 100 % a u jednotlivých vzorků se sledoval procentuální nárůst či pokles exprese.

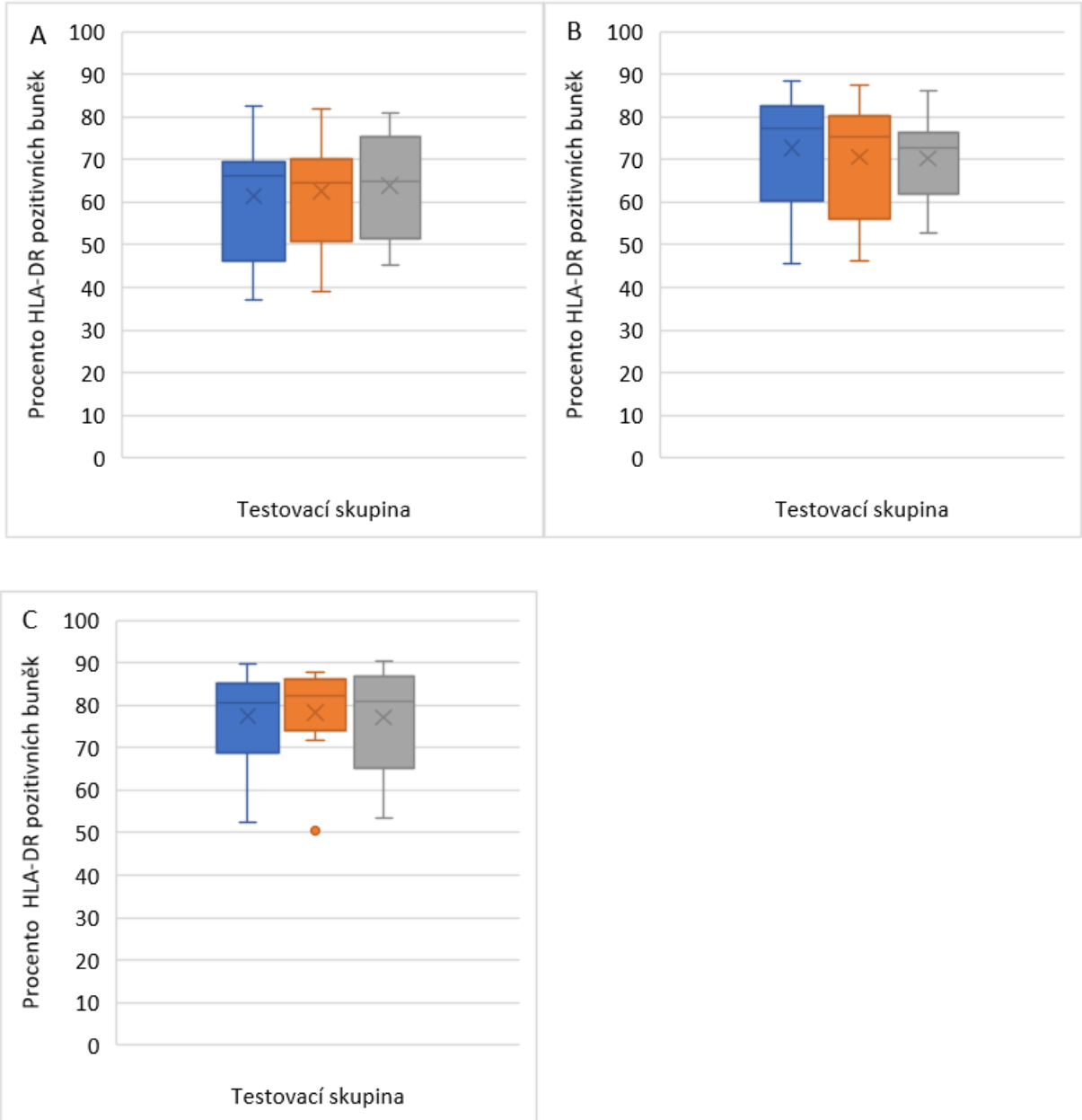
CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
100	91,12082	93,59534	100	89,0166	93,35888	100	94,83173	98,4375
100	107,2187	109,5541	100	91,22517	91,0596	100		94,51039
100	117,8354	116,0061	100	97,32034	91,71742	100	99,5439	100,9122
100	105,9621	122,7642	100	101,5419	115,859	100	96,37405	101,9084
100	96,5625	96,875	100	101,7264	93,22709	100	104,8208	99,13473
100	99,15357	97,94438	100	98,64407	97,40113	100	97,77035	100,6689
100	97,26225	94,23631	100	105,7366	97,13168	100	105,7357	103,3666
100	101,3473	99,7006	100	95,48969	93,5567	100	96,22166	98,23678
100	95,4023	108,046	100	94,98208	94,98208	100	97,27488	102,1327
100	117,2414	118,6207	100	93,68771	106,4784	100	103,7627	95,07959

Tab. XII: Primární data procentuálního zastoupení HLA-DR pozitivních buněk.

	24			48			72		
	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
i1	68,7	62,6	64,3	78,3	69,7	73,1	83,2	78,9	81,9
i2	47,1	50,5	51,6	60,4	55,1	55	67,4		63,7
i3	65,6	77,3	76,1	82,1	79,9	75,3	87,7	87,3	88,5
i4	36,9	39,1	45,3	45,4	46,1	52,6	52,4	50,5	53,4
i5	64	61,8	62	75,3	76,6	70,2	80,9	84,8	80,2
i6	82,7	82	81	88,5	87,3	86,2	89,7	87,7	90,3
i7	69,4	67,5	65,4	76,7	81,1	74,5	80,2	84,8	82,9
i8	66,8	67,7	66,6	77,6	74,1	72,6	79,4	76,4	78
i9	69,6	66,4	75,2	83,7	79,5	79,5	84,4	82,1	86,2
i10	43,5	51	51,6	60,2	56,4	64,1	69,1	71,7	65,7

Obr. 3: Množství HLA-DR pozitivních MNC buněk, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Grafy vycházejí z primárních

■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



Příloha 9 – intenzita HLA-DR – imunomodulační test

Tab. XIII: Vyhodnocení dat intenzity exprese HLA-DR po normalizaci, kde byla kontrola určena jako 100 % a u jednotlivých vzorků se sledoval procentuální nárůst či pokles exprese.

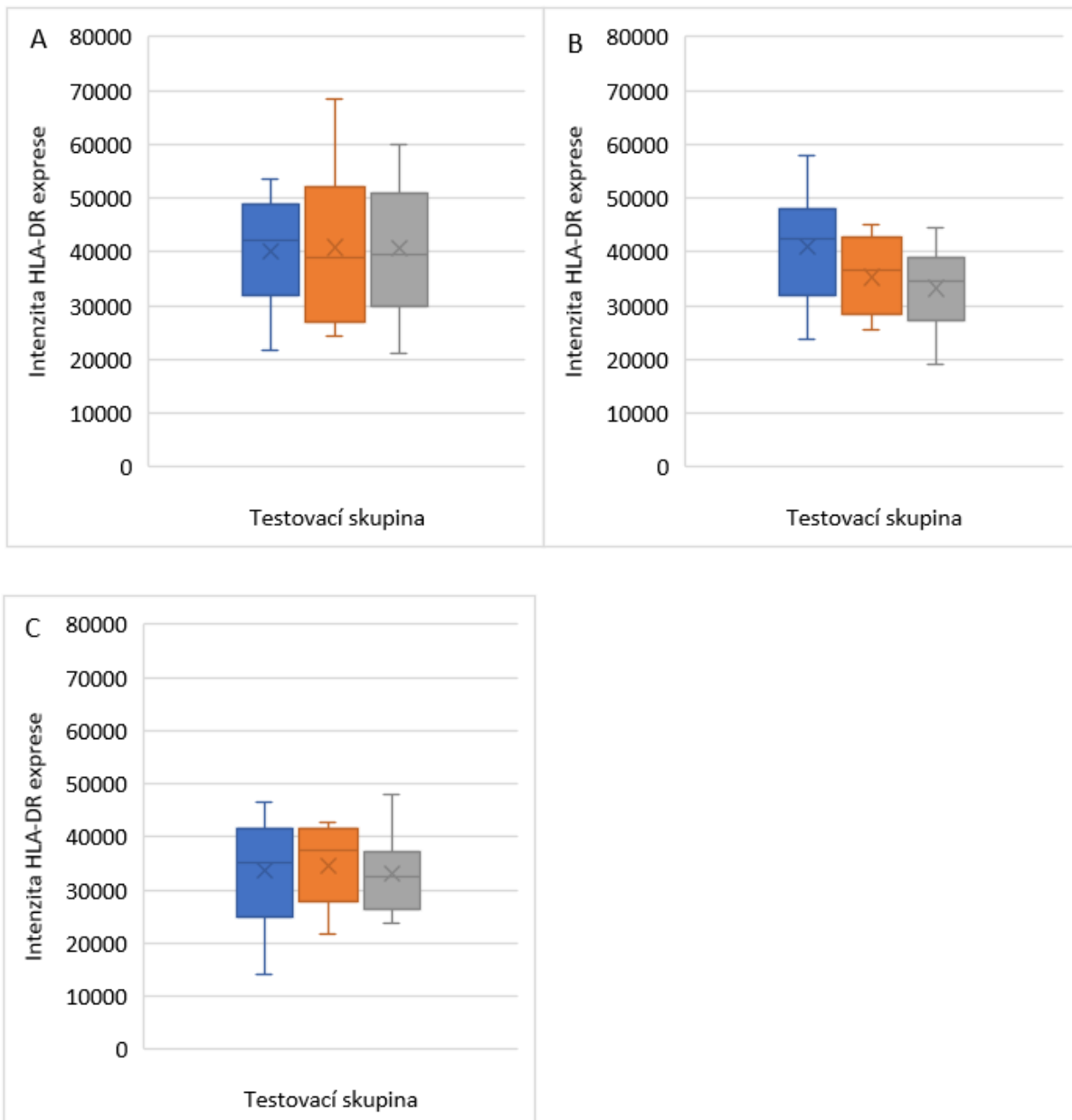
24			48			72		
CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
100	137,2283	116,3031	100	84,75941	88,33522	100	127,3481	81,0122
100	82,57407	86,72586	100	78,88011	70,19384	100		88,52801
100	129,4322	131,152	100	79,73325	72,19198	100	103,3751	104,6738
100	80,74609	89,41341	100	106,4332	123,5634	100	114,0267	124,1501
100	92,55981	89,72604	100	106,7335	86,79547	100	102,7718	91,6097
100	82,92643	87,60207	100	76,33692	81,29859	100	66,34107	90,45241
100	115,0576	98,12356	100	115,387	74,9676	100	201,879	183,2598
100	112,9855	109,8639	100	77,73243	64,2851	100	91,83766	103,2692
100	80,13449	91,39249	100	77,6707	82,0735	100	104,0487	113,3983
100	97,58844	108,3208	100	83,41161	91,08994	100	90,35625	73,17867

Tab. XIV: Primární data intenzity exprese HLA-DR.

	24			48			72		
	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
i1	49782	68315	57898	43207	36622	38167	33037	42072	26764
i2	53495	44173	46394	37093	29259	26037	34022		30119
i3	45705	59157	59943	45735	36466	33017	36266	37490	37961
i4	34232	27641	30608	23876	25412	29502	26414	30119	32793
i5	40335	37334	36191	41925	44748	36389	40082	41193	36719
i6	48742	40420	42699	54921	41925	44650	40848	27099	36948
i7	21690	24956	21283	25463	29381	19089	14050	28364	25748
i8	44080	49804	48428	58071	45140	37331	46494	42699	48014
i9	30485	24429	27861	33933	26356	27850	20846	21690	23639
i10	32593	31807	35305	45140	37652	41118	44267	39998	32394

Obr. 4: Intenzita exprese HLA-DR, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Grafy vycházejí z primárních dat.

■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1



Příloha 10 – intenzita CFSE– imunomodulační test

Tab. XV: Vyhodnocení dat intenzity exprese CFSE po normalizaci, kde byla kontrola určena jako 100 % a u jednotlivých vzorků se sledoval procentuální nárůst či pokles exprese.

24			48			72		
CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
100	100,7469	101,7736	100	94,32247	100,4688	100	113,2792	132,0325
100	96,1429	97,5716	100	105,6508	106,4115	100		114,0102
100	97,09503	97,57269	100	122,1959	123,3717	100	150,4007	136,2148
100	96,02116	97,63633	100	96,31354	100,4398	100	102,2184	108,1342
100	97,58022	98,05949	100	110,3985	110,6578	100	126,0471	127,5991
100	102,4073	98,58174	100	106,9749	99,57102	100	112,9341	101,7166
100	102,6675	106,1752	100	102,9328	103,6134	100	108,3799	112,9888
100	98,32341	100	100	103,9783	107,8732	100	101,2311	109,2707
100	103,1757	108,7913	100	101,8234	107,2629	100	108,1597	118,4534
100	102,4624	110,2197	100	106,0527	105,307	100	100,9933	70,95706

Tab. XVI: Primární data intenzity exprese CFSE.

	24			48			72		
	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1	CTRL	2:1	1:1
i1	43245	43568	44012	17490	16497	17572	5791	6560	7646
i2	76923	73956	75055	27872	29447	29659	10992		12532
i3	71808	69722	70065	24919	30450	30743	8734	13136	11897
i4	17769	17062	17349	7731	7446	7765	3516	3594	3802
i5	55501	54158	54424	18897	20862	20911	5348	6741	6824
i6	16076	16463	15848	6294	6733	6267	2505	2829	2548
i7	19044	19552	20220	8081	8318	8373	2864	3104	3236
i8	26542	26097	26542	11990	12467	12934	5361	5427	5858
i9	22420	23132	24391	9817	9996	10530	3983	4308	4718
i10	34316	35161	37823	18372	19484	19347	9665	9761	6858

Obr. 5: Intenzita exprese CFSE, 24 hod. (A), 48 hod. (B) a 72 hod. (C) od počátku inkubace s autologními mononukleárními buňkami. Grafy vycházejí z primárních dat. ■ CTRL ■ 2:1 ■ 1:1

