

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Dizertační práce

Praha, 2021

MUDr. Lucie Nováková

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



**Role iNKT buněk v
patogenezi infekčních a
autoimunitních onemocnění**

**The Role of iNKT Cells in the Pathogenesis of
Infectious And Autoimmune Diseases**

Dizertační práce

Školitel : prof. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D.

Školitel konzultant : doc. MUDr. Jan Novák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 01. 10. 2021

Lucie Nováková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Kozákovi, Ph.D., a konzultantovi doc. MUDr. Janu Novákovi, Ph.D., za jejich cenné rady, předané zkušenosti a hlavně za jejich nekonečnou trpělivost, týkající se nejenom mého vědeckého výzkumu. Dále bych ráda poděkovala IT oddělení 3. LF UK za pomoc ve chvílích, kdy mne textový editor “přestal poslouchat”.

Velké poděkování patří i mé rodině a přátelům za povzbuzení, motivaci a dobrou náladu po celou dobu mého dlouhého studia. Děkuji.

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

NOVÁKOVÁ, Lucie. Role iNKT buněk v patogenezi infekčních a autoimunitních onemocnění. [The Role of iNKT Cells in the Pathogenesis of Infectious And Autoimmune Diseases]. Praha, 2021. Počet stran: 102. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Hematologická klinika 3. LF a FNKV. Praha. Vedoucí disertační práce / Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Kozák, PhD.

Key words: invariant natural killer T cells (iNKT), varicella zoster, herpes simplex, NKG2D

OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	1
PODĚKOVÁNÍ	2
IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM	4
OBSAH.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
ABSTRAKT	9
SUMMARY.....	10
1. iNKT buňky	11
1.1. Definice a historie NKT buněk	11
1.2. Vývoj iNKT buněk.....	12
1.3. Tkáňová distribuce iNKT buněk.....	14
1.4. Fenotyp iNKT buněk	15
1.4.1. TCR iNKT buněk	15
1.4.2. T buněčné znaky.....	16
1.4.3. NK znaky.....	16
1.4.4. Receptory pro cytokiny	17
1.5. CD1d.....	17
1.5.1. CD1 geny.....	17
1.5.2. CD1 proteiny	18
1.6. Antigeny prezentované CD1d molekulou	19
1.6.1. Exogenní antigeny: α -Galactosyl Ceramide (α -GalCer)	19
1.6.2. Endogenní antigeny	20
1.6.3. Syntetické antigeny	21
1.6.4. Lipidové antigeny při virové infekci	22
1.7. Populace iNKT lymfocytů	22
1.8. Buňky podobné NKT lymfocytům.....	23
1.8.1. NKT lymfocyty typu II.....	23
1.8.2. Lidské CD161+ T lymfocyty	24
1.9. Funkce NKT buněk.....	24
1.9.1. Aktivace	25
1.9.2. Cytokinová produkce NKT buněk	26
1.9.3. Vliv na diferenciaci Th0 lymfocytů	27
1.9.4. Interakce s dalšími buňkami.....	28
1.9.5. Cytolytická aktivita	29
2. Role iNKT buněk v patologických procesech.....	30
2.1. iNKT a nádorová onemocnění	30
2.2. iNKT buňky a autoimunitní onemocnění	31
2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu	31
2.2.2. Roztroušená skleróza.....	35
2.2.3. Systémový lupus erytematodes (SLE).....	36
2.3. iNKT buňky v protiinfekční imunitě.....	36
2.3.1. Obecná data a principy antimikrobního působení iNKT buněk.....	36
2.3.2. Bakteriální infekce	38
2.3.3. Infekce mykotické, infekce prvoky a parazity	39
2.3.4. Virové infekce	39
3. iNKT buňky a herpesviry.....	44
3.1. Taxonomie a struktura herpesvirů.....	44
3.2. Imunitní reakce proti herpesvirům	46
3.3. iNKT buňky v experimentálních studiích s alfa-herpesviry	48

3.4. Data o roli iNKT buněk v imunitní reakci proti lidským herpesvirům	48
HYPOTÉZA.....	49
Materiál a metoda (VZV):.....	55
Výsledky (VZV):	57
Materiál a metoda (HSV-1):.....	65
Výsledky (HSV-1):	67
ZÁVĚREČNÁ DISKUZE.....	69
SEZNAM PUBLIKACÍ.....	81
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -GalCer	α -Galactosylceramide
APC	antigen prezentující buňka
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CTL	cytotoxický T lymfocyt
DC	dendritická buňka
DN	dvojitě negativní
HLA	lidský histokompatibilní komplex (Human Leucocyte Antigen)
HSV	herpes simplex virus
IFN	interferon
Ig	protilátka (imunoglobulin)
iGB3	isoglobotrihexosylceramid
IL	interleukin
KIR	killer-imunoglobulin like receptor
LPS	lipopolysacharid
mAb	monoklonální protilátka
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NK	NK buňka (natural killer cell)
NKT	NKT lymfocyt (natural killer T)
SAP	protein asociovaný se SLAM (SLAM associated protein)
SLAM	signální molekula pro lymfocytovou aktivaci (signaling lymphocytic activation molecule)
SLE	systémový lupus erythematoses
T1DM	diabetes mellitus 1.typu
T2DM	diabetes mellitus 2.typu

Tc	cytotoxický lymfocyt
TCR	T – buněčný receptor
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocné Th lymfocyty (T helper)
TNF	tumor necrosis factor
Treg	regulační T lymfocyty
VZV	varicella zoster virus

ABSTRAKT

iNTK buňky jsou thymus dependentní populace nekonvenčních T lymfocytů. Exprimují konstantní TCR řetězec V α 24J α 18 párovaný s omezeným spektrem β řetězců a rozpoznávají glykolipidové antigeny prezentované neklasickými MHC I. molekulami – CD1d - na povrchu APC. Tato malá subpopulace lymfocytů se podílí na imunitní odpovědi proti mnohým infekčním agens vč. virových infekcí a to i přesto, že viry neexprimují vlastní glykolipidové antigeny.

iNKT lymfocyty odlišuje od klasických T lymfocytů i rychlost jejich odpovědi. Velmi záhy po své stimulaci produkují velké množství cytokinů a to Th1, Th2 a Th17 profilu.

V mé dizertační práci popisují chování iNKT lymfocytů během infekce lidskými herpetickými viry. Popisují signifikantní snížení počtu iNKT u pacientů, kteří nekontrolují latentní VZV infekci a prodělávají časté reaktivace ve formě pásového oparu. Zjištěny a popsány jsou i fenotypové změny iNKT – zvýšená exprese NKG2D receptoru, downregulace NKG2A u skupiny pacientů během akutní infekce HSV-1, kvantitativní změna produkce TNF- α ve smyslu jeho zvýšení.

V závěru dizertační práce se zamýšlím nad obecnou pozicí iNKT buněk v imunitní odpovědi a nad jejich evolučním významem.

Naše výsledky naznačují podíl iNKT buněk na kontrole herpetických infekcí a napodobují více vrozenou imunitní reakci než adaptivní. U α -herpetických infekcí představují roli spíše agresorů než regulátorů imunitní odpovědi. Věřím, že naše práce přispěje k lepšímu porozumění této subpopulace nekonvenčních T lymfocytů.

SUMMARY

iNKT (invariant natural killer T cell) are thymus-dependent unconventional T cells. They express highly restricted TCR - V α 24J α 18 - chain paired with restricted set of β chains. iNKT cells recognize lipid antigens. These antigens are presented by CD1d molecule on the surface of APC. This small population of cells is involved in the immune responses against various infection agents including viral infection even though viruses do not express their own glycolipid antigens.

iNKT cells differ from classical T lymphocytes in the promptly production of cytokines of Th1, Th2 and Th17 profile.

Here I describe their behavior during reactivation of human herpes virus and their role in human defense against the varicella zoster virus. We observed decreased number of iNKT in patients who underwent reactivations of varicella zoster virus because they failed to control latent infection of VZV. Phenotypic changes of iNKT cells were also found and described – increased expression of the NKG2D receptor and downregulation of NKG2A in a group of patients during acute herpes simplex virus infection. iNKT cells enhance their capacity to produce TNF- α .

In the last part of my work, I will briefly describe general position of iNKT cells in the immune response and their evolutionary significance.

Our data suggests that iNKT cells are involved in the immune response against HSV and contribute mainly to its early innate phase.

iNKT cells play the role of aggressors rather than regulators of the immune response in the herpes viruses infections.

I believe that our work will contribute to a better understanding of this subpopulation of unconventional T cells.

1. iNKT buňky

1.1. Definice a historie NKT buněk

iNKT tvoří malou subpopulaci nekonvenčních $\alpha\beta$ T lymfocytů, která byla původně popsána u myši. Nekonvenční se nazývají proto, že se od klasických T lymfocytů liší v několika morfologických i funkčních charakteristikách. Tyto nekonvenční lymfocyty sice exprimují antigenspecifické receptory, ale mají zároveň některé charakteristiky typické pro vrozenou imunitu. Nejlépe prostudovanými členy této skupiny jsou $\gamma\delta$ T lymfocyty, MAIT buňky a právě NKT lymfocyty. V devadesátých letech tři výzkumné skupiny nezávisle na sobě publikovaly studie, poukazující na existenci $\alpha\beta$ -TCR⁺ T lymfocytů s atypickým povrchovým fenotypem CD3⁺CD4⁻CD8⁻, které zároveň exprimují receptor NK1.1, ten byl do té doby přisuzován výhradně NK buňkám [1], [2]. Taniguchi popsal buňky s imunosupresivním potenciálem, exprimující neměnný TCR α -řetězec V α 14-J α 18 [3]–[5]. Na základě koexprese NK a T znaků byly tyto buňky pojmenovány – natural killer T cell.

Významná část výzkumu iNKT buněk je spojena s francouzským vědcem Albertem Bendelacem, který mimo jiné poprvé publikoval studii, poukazující na restrikci CD1d molekulou a na potenciál velmi rychle po své aktivaci produkovat velké množství cytokinů - konkrétně IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 a TNF- α [6]–[8]. Buňky tohoto fenotypu byly později potvrzeny i u lidí [9].

Dnes již víme, že ne všechny NKT buňky exprimují NK1.1 receptor. Proto obecně přijímaná teorie definuje NKT buňky jako T lymfocyty exprimující neměnný TCR α řetězec kódovaný V α 14 - J α 18 geny u myši a V α 24 - J α 18 geny u lidí [10], párovaný s omezeným spektrem β řetězců (V β 2, V β 7 a V β 8 u myši a V β 11 u lidí) a

specificky rozpoznávající vlastní i cizí glykolipidové antigeny prezentované neklasickými MHC I. molekulami – CD1d - na povrchu APC [7], [8], [11]–[13].

iNKT regulují efektorovou funkci imunitních buněk, proto hrají důležitou roli v kontrole zánětlivé, nádorové i autoimunitní odpovědi. Je pravděpodobné, že bližší znalosti iNKT antigenů a mechanismů jejich aktivace by mohly být využity pro zlepšení terapie infekčních, autoimunitních i nádorových onemocnění.

1.2. Vývoj iNKT buněk

iNKT jsou thymus dependentní lymfocyty původem z kostní dřeně. Svou maturaci dokončí v thymu, odkud následně migrují převážně do jater a sleziny. Zásadním vývojovým mechanismem iNKT buněk je pozitivní selekce CD1d molekulou exprimovanou nezralými $CD4^+CD8^+$ thymocyty [14], [15]. iNKT vznikají v thymu o chvíli později než konvenční T lymfocyty [16]. iNKT se během vývoje oddělují od konvenčních T lymfocytů ve stádiu dvojitě pozitivních (DP) thymocytů [16].

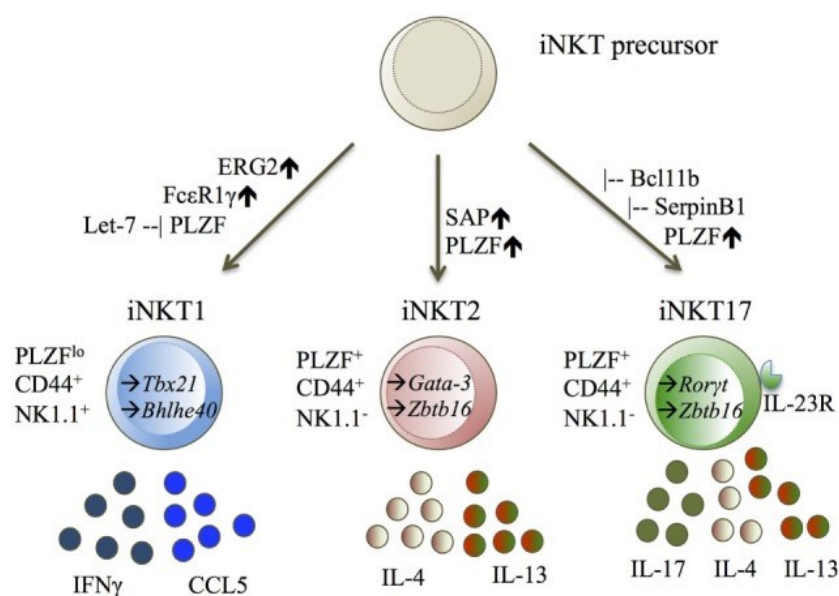
Na rozdíl od staršího názoru, který byl založen na lineárním modelu vývoje iNKT lymfocytů, kdy se vědci domnívali, že všechny iNKT lymfocyty projdou postupně vývojovým stádiem 0-3, se nyní přikláníme k modelu vývoje, který předpokládá existence společné progenitorové buňky NKT0 a k následné diferenciaci na 3 hlavní subpopulace iNKT1, 2 a 17 [16]. Rozdělení do těchto subpopulací je dáno expresí kombinace transkripčních faktorů PLZF, T-bet, Gata3 a ROR γ t [17]. Hlavním regulátorem pro linii iNKT buněk je transkripční faktor PLZF [18], [19]. Exprese PLZF je nejvyšší u iNKT 2, střední hodnoty dosahuje u iNKT17 a nejnižší exprese najdeme u iNKT 1. Příslušnost k jednotlivým subpopulacím (iNKT1, iNKT2 a iNKT17) je předurčena během vývoje v thymu, stále však není jasné, zda toto

rozdělení je permanentní, či zda je možné ho později modulovat [20].

Obrázek 1

Vývoj iNKT1, iNKT2 a iNKT 17 ze společného prekursoru a jejich vztah k transkripčním faktorům, jejich povrchové molekuly a cytokinová produkce [21].

Diagram legends: - inhibiting, ↑ upregulated, → expressed transcription factors



Jak již bylo uvedeno, NKT buňky se vyvíjí v thymu z DP thymocytů. DP thymocyty setrvávají v kůře thymu přibližně 4 dny, během této doby dochází k náhodné somatické rekombinaci TCR genových segmentů. Kritickým faktorem pro vývoj NKT lymfocytů je vznik segmentu V α 14-J α 18.

CD1d jsou v thymu exprimovány jak thymocyty, tak i buňkami retikulárního epitelu. iNKT jsou selektovány z DP thymocytů po rozpoznání CD1d molekuly na povrchu těchto DP thymocytů, zatímco k selekci konvenčních T lymfocytů je nutné

rozpoznání MHC komplexu na povrchu epitelových buněk [22]. Po pozitivní selekci v thymu iNKT lymfocyty expandují a prodělávají maturační proces, ve kterém získávají fenotyp podobný NK buňkám [23].

Většina iNKT lymfocytů opouští thymus v nezralém stavu, kdy neexprimují NK receptory (zejména NK1.1) a svůj proces dozrávání dokončují až v periférii [24]–[26]. Značná část iNKT maturací v periférii přesto nezíská NK znaky a tyto NK1.1⁻ iNKT lymfocyty jsou funkčně odlišné od svých NK1.1⁺ protějšků [27].

Navíc velké množství iNKT dlouhodobě zůstává v thymu a zde dozrává na NK1.1⁺ fenotyp [28]. Dosud není znám mechanismus zodpovědný za export/retenci iNKT lymfocytů v thymu v různých stupních jejich vývoje [29].

Byla prokázána nezbytnost GM-CSF signalizace během vývoje v thymu. Tato interakce umožní zralým iNKT buňkám produkci IL-4 a IFN- γ po jejich aktivaci v periférii [30]. Při absenci této signalizace si iNKT uchovávají schopnost transkripce i translace IL-4 a IFN- γ , ale nebudou schopné tyto cytokiny secernovat.

Lidské iNKT buňky jsou detekovatelné v thymu, slezině a játrech již při narození. Zatímco u myši se objeví až 5. den. Jejich proporce a absolutní množství postupně stoupají až do období pohlavního dospívání. V dospělosti zůstávají jejich počty stabilní a klesají až v seniu [31].

1.3. Tkáňová distribuce iNKT buněk

iNKT buňky byly detekovány ve všech tkáních, kde se nalézají konvenční T lymfocyty. Percentuální zastoupení iNKT buněk se však liší nejenom podle živočišného druhu (myš versus člověk), ale také podle typu orgánu. U myši je jejich frekvence v krvi 0,2 - 0,5 % a jsou dominantní lymfocytární populací v játrech

(10-50%), dále se vyskytují ve slezině (1-2%), thymu (0,5-1%), kostní dřeni (0,5%) [12], [13] a periferních lymfatických uzlinách (0,5%) [32].

iNKT buňky jsou výrazně vzácnější lymfocytární populací u lidí. V periferní krvi tvoří jen 0,01 – 0,1% lymfocytů [33], [34] a i jejich tkáňová distribuce je odlišná od myši – ve slezině, kostní dřeni a lymfatických uzlinách je zastoupení totožné s periferní krví, játra (1%), omentum (10%) [33].

1.4. Fenotyp iNKT buněk

Většina iNKT lymfocytů vykazuje paměťový fenotyp – CD69⁺, CD62L^{low}, CD44^{high} a CD122^{high} a typicky exprimují kombinaci NK receptorů jako je NK1.1, NKG2D a Ly49. U myši jsou iNKT CD4⁺ nebo CD4⁻ CD8⁻ (DN), zatímco lidské iNKT mohou být i CD8⁺ [35].

1.4.1. TCR iNKT buněk

iNKT sdílejí s T lymfocyty T buněčný receptor (TCR). Avšak, na rozdíl od nekonečného množství variant TCR řetězce klasických T lymfocytů, všechny iNKT buňky exprimují jen jeden α řetězec V α 24-J α 18 u lidí a V α 14-J α 18 u myši. Zároveň bylo prokázáno preferenční párování V α 24 řetězců s limitovaným spektrem β řetězců - V β 8.2, V β 7, V β 8.3, V β 2 a V β 1 u myši [11] a V β 11 u lidí [36].

NKT I. a II. typu mají rozdílný V (variabilní) genový segment v α - a β -řetězcích svých TCR a rozpoznávají různé antigeny prezentované CD1d molekulou [36].

1.4.2. T buněčné znaky

Vedle TCR exprimují iNKT buňky i další typické znaky pro T lymfocyty. Receptor CD3 je párován buď s CD4, nebo oba receptory CD4 i CD8 chybí. Pouze malá část iNKT buněk exprimuje pouze CD8⁺ [10].

1.4.3. NK znaky

Exprese NK znaků byla původně používána k detekci iNKT buněk. iNKT buňky byly původně definovány jako TCR⁺NK⁺. Některé iNKT buňky skutečně exprimují CD122, Ly6C^{hi}, Ly49A, Ly49C, NKG2D, NKG2A u myši [12], [13], [37] a CD161, 2B4, CD94, NKG2A a NKG2D u lidí. [33], [38], [39]. Přesto, že většina NKT lymfocytů skutečně exprimuje NK receptor, exprese tohoto receptoru však byla prokázána i u jiných buněčných populací (např. aktivované konvenční CD8 T lymfocyty) Navíc exprese NK receptorů NKT buňkami závisí na jejich vývojovém stádiu i na jejich aktivaci.

V současné době tudíž víme, že mnoho TCR⁺NK⁺ buněk jsou klasické T lymfocyty a naopak, mnoho iNKT buněk neexprimuje NK znaky. Také je známo, že nezralé iNKT neexprimují NK1.1(CD161) a exprese těchto receptorů je downregulovaná po dobu několika dní po aktivaci zralých iNKT buněk *in vivo*.

iNKT buňky se proto nyní definují dle TCR specifity buď monoklonálními protilátkami proti jejich specifickému TCR nebo pomocí CD1d- α -GalCer tetramerů. TCR⁺NK⁺ koexprese se již k identifikaci iNKT buněk nepoužívá [10].

1.4.4. Receptory pro cytokiny

V klidovém stavu exprimují NKT buňky široké spektrum cytokinových receptorů, proto mají i schopnost na toto široké spektrum cytokinů reagovat. Jmenovitě IL-12 [40],[41], IL-18 [42], IL – 23 samostatně nebo v kombinaci s IL - 1 β [43], IL-25 [44] a IFN typu I. [45]. V závislosti na zastoupení cytokinů při zánětlivé odpovědi, iNKT produkují různé spektrum cytokinů. IFN- γ v odpovědi na IL-12, IL-18 nebo IFN typu I. IL-17 při stimulaci IL-23 a IL-22 při současném vlivu IL-23/IL-1 β [46].

1.5. CD1d

CD1 systém zahrnuje geny a proteiny, které hrají roli ve zpracování a prezentaci antigenů na bázi lipidů a glykolipidů [47].

Myší iNKT rozpoznávají lidskou CD1d molekulu a naopak. Toto zjištění, společně s vysokou mírou konzervovanosti populace, předpokládá velkou důležitost iNKT lymfocytů v imunitních reakcích.

1.5.1. CD1 geny

CD1 geny jsou lokalizovány na chromosomu číslo 1 u lidí a číslo 3 u myší [48]. Pěti lidským CD1 genům (CD1A, CD1B, CD1C, CD1D a CD1E) odpovídá prakticky jen jeden myší (CD1D) gen [49]. Na rozdíl od charakteristického polymorfismu MHC genů I. a II. třídy, alelické variace CD1 genů jsou extrémně limitované [47]. Navíc existuje výrazná homologie sekvencí mezi různými živočišnými druhy. Výrazná mezidruhovú homologie CD1 genů předpokládá, že CD1 geny jsou evolučně velmi staré a zastávají důležitou, většině savcům společnou funkci [50].

1.5.2. CD1 proteiny

CD1 je rodina glykoproteinů, exprimovaných na antigen prezentujících buňkách (APC). Jsou to neklasické MHC molekuly I. třídy a zodpovídají za prezentaci lipidových a glykolipidových antigenů. Pěti CD1 genům odpovídá pět CD1 proteinů CD1a, CD1b, CD1c, CD1d a CD1e [47]. CD1a, CD1b, CD1c a CD1d jsou exprimovány na povrchu buněk, zatímco CD1e je intercelulární protein, usnadňující prezentaci glykolipidů [51]. CD1d proteiny jsou exprimovány dendritickými buňkami (DC), B i T lymfocyty, makrofágy, monocyty, Langerhansovými buňkami v kůži, ale i buňkami mimo imunitní systém jako jsou gastrointestinální a cervikální epitelové buňky nebo buňky parenchymatózních orgánů – plic či jater [52]. Pro exogenní antigeny jsou DC hlavními aktivátory iNKT buněk. APC se zvýšenou expresí CD86 (kostimulační signál pro aktivaci T lymfocytů) vede spíše k Th1 cytokinovému profilu, zatímco zvýšená APC exprese PD-L2 (Programmed death-ligand) posouvá cytokinovou odpověď směrem k Th2 profilu.

CD1 molekuly jsou transmembránové glykoproteiny, které mají některé strukturálně společné znaky s MHC I. molekulou – jeden těžký řetězec složený ze 3 domém ($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$) nekovalentně navázaný na $\beta 2$ - mikroglobulin přes $\alpha 3$ doménu. Doména $\alpha 1$ a $\alpha 2$ tvoří hluboké hydrofóbní kapsy (nazývané A' a F') pro navázání uhvodíkového řetězce glykolipidového antigenu. Po navázání lipidový řetězec vystupuje nad povrch a je tak připraven k interakci s iTCR na NKT lymfocytech [53].

CD1 molekuly se však liší od MHC molekul I. a II. třídy nejen mechanismy zpracování a intracelulárního transportu antigenů [54], ale také způsobem povrchové exprese, nezávislým na maturationím stavu buňky. Díky tomu jsou i nezralé dendritické buňky schopny aktivovat CD1 závislou T buněčnou odpověď [55].

iNKT buňky jsou stimulované CD1d molekulou i v nepřítomnosti exogenních antigenů, což předpokládá jejich reaktivitu s tělu vlastním antigenem [8], [56]. I přes intenzivní výzkum posledních let se dosud nepodařilo tento ligand jednoznačně identifikovat [57], [58]. Vedle endogenních antigenů rozpoznávají iNKT buňky exogenní antigeny bakterií, mycobakterií a jednobuněčných eukaryot [59], [60].

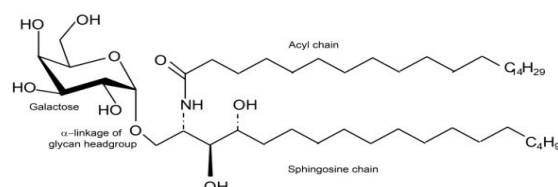
CD1d ligandy spouští cytokinovou odpověď Th1 nebo Th2, v závislosti na složení jejich lipidových součástí. Ligandy, které jsou součástí buněčného povrchu, vedou spíše k Th2 odpovědi [61].

1.6. Antigeny prezentované CD1d molekulou

1.6.1. Exogenní antigeny: α -Galactosyl Ceramide (α -GalCer)

Farmaceutická firma Kirin Pharmaceutical Research corporation objevila první ligand iNKT buněk. α -GalCer (známý také jako KRN7000). Jedná se o látku glykolipidové povahy. Byla izolována původně z mořské houby *Agelas Mauritanius* a je schopná eradikovat experimentální metastázy [62]. Tento glykolipid byl později syntetizován v laboratořích Kirin. Kawano zjistil, že eradikace experimentálních metastáz α -GalactosylCeramidem je dána specifickou stimulací iNKT buněk [63].

Obrázek 2. *Struktura α -GalactosylCeramidu* [64]



α -GalCer má α -vázanou galaktózu, sphingoidní bázi s 13 uhlíky a acylový řetězec s 26 uhlíky. α -GalCer vede k silné Th1 i Th2 odpovědi [65],[66], což je hlavním důvodem jeho neúspěšného využití v protinádorové terapii, která je Th1 dependentní. Dalším důvodem může být nižší afinita α -GalCer/CD1d komplexu

k lidskému TCR než k myšimu [53]. Důležitým faktorem je i typ APC. V klinických studiích bylo prokázáno, že transfer dendritických buněk (DC) po předchozí inkubaci s α -GalCer vede k silnější iNKT odpovědi než samotný α -GalCer [66],[67],[68].

1.6.2. Endogenní antigeny

Po objevení prvních antigenů pro iNKT buňky se předpokládalo, že vazba cukru na lipid může být pouze α -anomerní a že β -anomerní forma nevede k aktivaci iNKT [63],[69]. Podrobnější výzkum zaměřený na vývoj iNKT v thymu potvrdil hypotézu, že musí existovat „vlastní ligand“, který se účastní pozitivní selekce. Vazba β -cukru na ceramid je u savců běžná, neboť je součástí buněčných membrán [70],[71]. Prvním identifikovaným endogenním antigenem u myši je isoglobotrihexosylceramide (iGb3) [72]. Některé studie tudíž poukazují na důležitost glykosfingolipidu isoglobotrihexosylceramidu (iGb3) k selekci iNKT v thymu i k jejich aktivaci v periférii [60].

Podle jiných studií je však jeho vliv na pozitivní selekci v thymu sporný, neboť myši deficitní na iGb3 syntetázu (esenciální k produkci iGb3) mají normální hladiny iNKT [73]. Zároveň již víme, že lidský CD1d nedokáže prezentovat iGb3 a iGb3 se nenachází ani v thymu lidském ani u myši [74]. Je tudíž zřejmé, že iGb3 není domnívaným endogenním antigenem nezbytným pro pozitivní selekci v thymu.

Druhým identifikovaným endogenním antigenem je β -glucosyl ceramid (β -GlcCer), strukturálně velmi podobný α -GalCer. Jeho hladina prokazatelně stoupá v přítomnosti mikrobiální infekce [75] jako odpověď na aktivaci Toll-like receptorů, čímž vede k aktivaci iNKT i bez přítomnosti exogenního lipidového antigenu.

Ve studii z roku 2012 došlo po aplikaci β -GlcCer ke zvýšení počtu iNKT buněk a k inhibici nádorových metastáz u myši [76]. Jiné výzkumné skupiny toto

zpochybňují a aktivaci iNKT přisuzují kontaminaci α -anomerními glykolipidy, které mohou vznikat při syntéze β -glykolipidů. [77], [78].

Lze shrnout, že iNKT buňky tedy rozpoznávají glykosfingolipidy (GSL) a některé další typy glykolipidů po jejich prezentaci CD1d molekulou na povrchu APC. GSL patří do rozsáhlé skupiny sfingolipidů. Jsou to deriváty ceramidů, na jejichž první uhlík je navázána sacharidová složka [79]. Ceramidy obsahují sfingoidní bázi připojenou amidovou vazbou k mastné kyselině [80]. U GSL je sacharidová složka (nejčastěji galaktosa nebo glukosa) navázána na první alkoholovou skupinu sfingoidní báze. Protože první uhlík je asymetrický, může se vyskytnout jako α nebo β anomer. Orientace β je u savců dominantní [81].

1.6.3. Syntetické antigeny

V současné době existuje celá řada dalších syntetických substancí specificky stimulujících iNKT buňky syntetizovaných většinou s cílem ovlivnit spektrum cytokinů produkovaných iNKT buňkami [82]–[84].

Díky velmi vysoké afinitě iNKT buněk pro α -GalCer je jejich vzájemná vazba velmi specifická [85]. Specifity a senzitivity této reakce bylo využito k syntéze CD1d- α -GalCer tetramerů. CD1d proteiny jsou laboratorně produkovány bakteriálními buňkami, chromatograficky purifikovány a na závěr inkubovány s α -GalCer. CD1d- α -GalCer tetramery jsou používány k cytometrické detekci myších i lidských iNKT buněk [12], [13] a představují nejcitlivější, ale také nejdražší, metodu detekce iNKT buněk.

Hydrofobní řetězce lipidových antigenů jsou vázány hluboko v „kapse“ CD1d molekuly a polární skupina je vystavena k rozpoznání pomocí TCR iNKT buňky.

TCR iNKT lymfocytů rozpoznávají galaktózovou skupinu GSL, tudíž manipulace s touto skupinou ovlivňuje vazbu s TCR [86],[87].

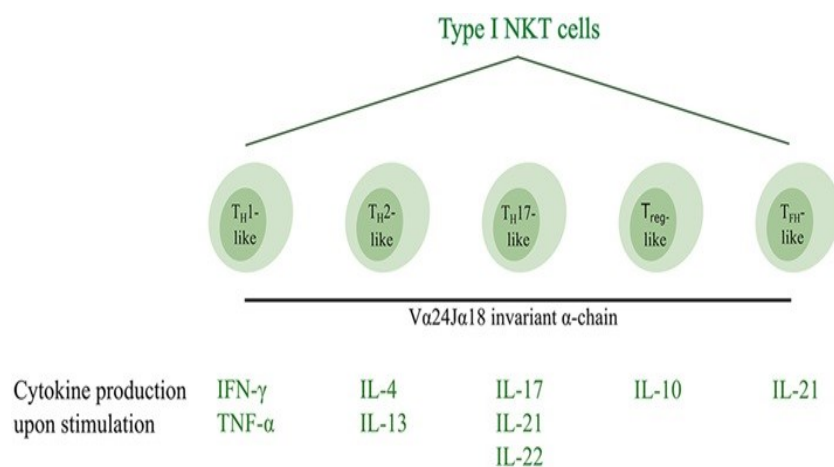
1.6.4. Lipidové antigeny při virové infekci

Lipidový antigen virů nebyl dosud prokázán. iNKT se však významně uplatňují i v protivirové imunitě [88], což je tudíž další příklad aktivace iNKT bez přítomnosti exogenního lipidového antigenu. Přesný mechanismus tohoto účinku je nejasný. Některé studie se přiklánějí k cytokiny – mediované aktivaci, jiné studie poukazují na možnost CD1d dependentní aktivace [89],[90],[91].

1.7. Populace iNKT lymfocytů

Rozlišujeme 5 základních a funkčně odlišných subpopulací iNKT lymfocytů. Liší se typem secernovaných cytokinů a expresí odlišných transkripčních faktorů. Tyto subpopulace zahrnují iNTK 1, iNKT2, iNTK17, iNKT_{FH} (follicular helper) a iNKT10 (iNKT_{reg}). Jednotlivé cytokiny produkované konkrétními subpopulacemi jsou znázorněny níže na obrázku 3. iNTK_{FH} a iNTK10 lymfocyty nebyly zatím popsány v thymu a jejich původ a vývoj není dosud objasněn [20]. iNKT_{FH} jsou detekovány u myši ve slezině po stimulaci lipidovým antigenem [92]. iNKT10 byly po stejné antigení stimulaci popsány v tukové tkáni [93], [94].

Obrázek 3 Subpopulace *i*NKT lymfocytů a cytokiny, které produkují jednotlivé subpopulace po své aktivaci [95].



1.8. Buňky podobné NKT lymfocytům

1.8.1. NKT lymfocyty typu II.

Vedle *i*NKT buněk existují u myši i lidí další buněčné populace s omezeným TCR repertoárem rozpoznávající CD1d molekulu [96], [97]. Tyto buňky se označují jako 2. kategorie NKT buněk. Jejich TCR receptor má větší variabilitu než TCR receptor NKT I. typu. NKT II. typu nerozeznávají α -GalCer [98], [99]. V dnešní době nejlépe prostudovaným antigenem NKT II. je sulfatid, který se ve větší míře vyskytuje v nervové tkáni [100]. Jejich frekvence je ještě nižší než *i*NKT buněk. Tyto buňky brání v experimentálním modelu rozvoji diabetu 1. typu [101]. U lidí jsou lokalizovány především v játrech a kostní dřeni. Jejich fyziologická funkce zatím není známa [102]. Mimo buňky s omezeným TCR repertoárem je CD1d reaktivita charakteristická i pro značnou část polyklonálních T lymfocytů [10], [103]. Tyto buňky nejsou tématem mé práce.

Obrázek 4: Klasifikace a znaky iNKT a iNKT – podobných buněk [10]

	Type I cells (Classical NKT cells)	Type II cells (Non-classical NKT cells)	NKT-like cells (CD1d-independent NK1.1 ⁺ T cells)
CD1d dependent	Yes	Yes	No
α -GalCer reactive	Yes	No*	No
TCR α -chain	V α 14-J α 18 (mice) V α 24-J α 18 (humans)	Diverse, but some V α 3.2-J α 9, V α 8 (mice)	Diverse [‡]
TCR β -chain	V β 8.2, V β 7 and V β 2 (mice) V β 11 (humans)	Diverse, but some V β 8.2 (mice)	Diverse [‡]
NK1.1 (CD161)	+ (resting mature) -/low (immature or post-activation)	+/-	+
Subsets	CD4 ⁺ and DN (mice) CD4 ⁺ , CD8 ⁺ and DN (humans)	CD4 ⁺ and DN (mice)	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ and DN
IL-4 production	Yes	Yes	No
IFN- γ production	Yes	Yes	Yes

*In humans, some CD1d-restricted V α 24/V β 11⁻, α -galactosylceramide (α -GalCer)-reactive T cells have been identified. †Although most natural killer T (NKT)-like cells express diverse T-cell receptors (TCRs), some subsets (for example, mucosal-associated invariant T cells) express semi-invariant TCRs. In mice, NKT cells have been traditionally defined as NK1.1⁺ T cells. However, it is clear that expression of NK-cell markers is not unique to classical, CD1d-dependent NKT cells, which has resulted in confusion in the literature. We compare and contrast the different populations of cells that are often referred to as NKT cells, by dividing these into three different cell types: type I NKT cells, type II NKT cells and NKT-like cells. DN, CD4⁺CD8⁻ double negative; IFN- γ , interferon- γ ; IL-4, interleukin-4.

1.8.2. Lidské CD161+ T lymfocyty

Jak již bylo zmíněno - koexprese NK a T znaků nedefinuje jednoznačně iNKT buňky. Koexprese znaků těchto dvou linií je typická i pro T lymfocyty rozeznávající CD1a, b a c molekuly [50], aktivované klasické CD4 i CD8 lymfocyty (především u virových infekcí), ale také nově objevené MAIT buňky [104].

1.9. Funkce iNKT buněk

iNKT lymfocyty se od klasických T lymfocytů liší nejenom vývojovými a morfologickými charakteristikami, ale také funkcí. Vykazují charakteristiky typické jak pro vrozenou, tak získanou imunitu a slouží tudíž k „přemostění“ těchto dvou typů imunitní odpovědi. iNKT buňky funkčně odlišuje od klasických T lymfocytů především rychlost jejich odpovědi, která napodobuje spíše vrozenou imunitní reakci

než adaptivní, dále schopnost iNKT buněk produkovat ihned po stimulaci významné množství cytokinů jako IL-4 a IFN- γ nebo schopnost inhibovat jiné buněčné populace.

1.9.1. Aktivace

iNKT buňky mohou být stimulovány přímo prostřednictvím TCR, NK receptorů nebo nepřímo kombinací prozánětlivých cytokinů [105]. V závislosti na afinitě lipidových antigenů může jednotlivý aktivační signál převažovat. Vysoce afinní antigen vede k silné aktivaci přes TCR bez nutnosti současné cytokinové stimulace. Naopak slabý antigen vyžaduje k aktivaci NKT buněk současnou stimulaci prozánětlivými cytokiny z APC. Cytokiny zprostředkovaná aktivace může být natolik silná, že vede k aktivaci NKT buněk i v případě, že molekulou CD1d nejsou exprimovány žádné mikrobiální lipidové antigeny, jak je tomu například u virových infekcí. Stejný mechanismus vysvětluje aktivaci NKT i v nádorové imunitě a autoimunitních procesech [106],[107].

1.9.1.1 Aktivace pomocí TCR

Signalizace prostřednictvím TCR vede k rychlému rozvoji efektorových funkcí iNKT buněk. Tato aktivace vyžaduje rozpoznání glykolipidu ve vazbě na CD1d molekulu. Jak již bylo uvedeno, CD1d molekula je primárně exprimována antigen prezentující buňkou (APC), ale může být exprimována také epitelovou buňkou, parenchymatózní buňkou a hladkými svalovými buňkami cév [108] ,[109].

Aktivace iNKT buněk prostřednictvím TCR je regulována inhibičními NK receptory jako Ly49A, C/I a Ly49G2 [63].

1.9.1.2 Aktivace NK 1.1 receptorem

Stimulace NKR-P1 (NK1.1) u myši vede k aktivaci iNKT buněk a indukuje sekreci Th1 cytokinů iNKT buňkami [110]. U lidí funguje signalizace NKR-P1A (CD161) jako kostimulace pro aktivaci TCR [111].

1.9.1.3 Aktivace cytokiny

iNKT dále exprimují receptory pro cytokiny. Jejich vazba současně se stimulací TCR deviuje cytokinovou sekreci (IL-7 směrem k Th2 odpovědi, IL-12 a IFN- γ ve prospěch Th1 profilu). IL-12, IL-15 a IL-18 jsou schopné indukovat proliferaci a produkci cytokinů iNKT buňkami i v absenci TCR signalizace [47].

1.9.2. Cytokinová produkce iNKT buněk

Po antigenní stimulaci iNKT buňky velmi rychle produkují spektrum cytokinů a to Th1, Th2 i Th17 typu odpovědi [29].

Stimulace prostřednictvím NK1.1 receptoru vede k sekreci pouze IFN- γ [110]. TCR stimulace indukuje sekreci širokého spektra cytokinů. Během minut jsou po stimulaci detekovány IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- γ , TNF- α a GM-CSF [29].

Lidské iNKT buňky produkují také spektrum chemokinů a exprimují receptory pro chemokiny podobné efektorovým Th1 a CD8⁺ T lymfocytům (CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR3, CXCR4 and CXCR6), což reflektuje jejich schopnost rychle migrovat do zánětlivých ložisek [112]–[114].

CD4⁺ iNKT jsou prakticky jediným producentem Th2 cytokinů IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 [33], [34] a více komunikují s B lymfocyty – helper funkce. Oproti

tomu DN a pravděpodobně i CD8⁺ iNKT buňky obstarávají efektorové funkce jako cytotoxicitu a secernují především Th1 cytokiny (IFN- γ a TNF- α) [34].

Porozumění mechanismu rychlé duální produkce IL-4 a IFN- γ po stimulaci α -GalCer je klíčové pro možnost klinického využití. Většina iNKT v játrech začne produkovat IL-4 i IFN- γ [115].

Zjištění, že klidové iNKT lymfocyty obsahují velké množství mRNA pro IL-4 a IFN- γ , může být jedním z potenciálních mechanismů, proč dochází k uvolnění cytokinů tak rychle po aktivaci [116],[117]. Regulace cytokinové produkce probíhá i na úrovni transkripčních faktorů. iNKT exprimují oba transkripční faktory T-bet a GATA -3, což vede k transkripci IFN- γ i IL-4. Jinak je tomu u konvenčních T lymfocytů, kde transkripční faktor T-bet potlačuje expresi GATA-3 a naopak [118].

Je patrné, že cytokiny iNKT buněk vykazují prozánětlivé i imunoregulační vlastnosti a mohou se tak podílet na protektivním i škodlivém účinku u mnoha patologických stavů, zahrnující zánětlivé a autoimunitní onemocnění, alergie i malignity. iNKT tudíž nabízejí imunoterapeutické možnosti s velkým klinickým potenciálem.

1.9.3. Vliv na diferenciaci Th0 lymfocytů

iNKT buňky hrají důležitou roli v diferenciaci naivních Th0 buněk v Th1 versus Th2 fenotyp [119]. Schopnost produkovat IL-4 a indukovat Th2 imunitní odpověď byl jeden z objevů, vedoucí k identifikaci iNKT buněk [120],[121]. Pozdější práce však prokázaly, že iNKT buňky ovlivňují Th1/Th2 bilanci komplexnějším mechanismem. iNKT buňky indukují Th1/Th2 odpověď v závislosti na mnoha dalších faktorech jako přítomnost kostimulace (indukce Th2 odpovědi vyžaduje kostimulaci na rozdíl od Th1), typ antigenu (podání α -GalCer může vést k rozvoji Th1 i Th2

odpovědi, ale nově vyvinuté syntetické ligandy preferenčně indukují buď Th2 nebo Th1 odpověď), počet expozičních antigenů (jedna injekce α -GalCer vede k produkci IFN- γ i IL-4, opakované podání polarizuje imunitní odpověď Th2 směrem) a cytokinové prostředí (expoziční iNKT buněk cytokinům současně s TCR stimulací ovlivňuje cytokinové sekreční profily - IL-7 směrem k Th2 zatímco IL-12 a IFN- γ směrem Th1).

1.9.4. Interakce s dalšími buňkami

iNKT buňky komunikují s celou řadou buněk vrozené i adaptivní imunity. Jejich interakce jsou mediované buď cytokiny nebo přímými mezibuněčnými kontakty.

IFN- γ a IL-2 produkované iNKT buňkami aktivují NK buňky k proliferaci, sekreci IFN- γ a cytotoxickým funkcím [122], [123]. Prostřednictvím IL-2 stimulují iNKT buňky i paměťové CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty [124].

iNKT buňky intenzivně komunikují s B lymfocyty podobným způsobem jako klasické Th lymfocyty - dodávají signál B lymfocytů k proliferaci a produkci imunoglobulinů [125].

iNKT buňky dále aktivují makrofágy a mobilizují myeloidní prekurzory z kostní dřeně [126].

Významná je oboustranná interakce s DC buňkami. V přítomnosti infekce či při stimulaci PRR (pattern recognition receptor) interakce DC-iNKT (prostřednictvím CD40-CD40L) urychluje dozrávání DC a zvyšuje produkci IL-12 [127]. Zároveň DC buňky prezentují lipidový antigen na povrchu pomocí CD1d molekuly a produkcí IL-12 aktivují iNKT lymfocyty. Tato aktivace ve svém důsledku vede k indukci vrozené

i získané imunitní odpovědi – aktivují NK buňky a zesilují odpověď CD4⁺ a CD8⁺ klasických T lymfocytů na peptidové antigeny [128], [129].

1.9.5. Cytolytická aktivita

iNKT buňky mají schopnost nejen rychle po své aktivaci uvolňovat cytokiny a chemokiny, zároveň dokáží působit i cytolyticky a mohou ovlivnit chování ostatních buněk imunitního systému. Cytolytická aktivita iNKT koresponduje s vysokou produkcí granzymu B, perforinu a FasL iNKT lymfocyty [118].

2. Role iNKT buněk v patologických procesech

2.1. iNKT a nádorová onemocnění

Výzkum iNKT je úzce spjat s výzkumem onkologickým. Ligand iNKT buněk α -GalCer byl objeven v rámci firemního screeningu substancí schopných navodit rejekci metastáz solidních tumorů a α -GalCer byl prvně klinicky použit právě u onkologických pacientů.

Výzkumy posledních let ukazují, že iNKT buňky mohou hrát ve vztahu k nádorovým onemocněním dvojstrannou roli. Na jednu stranu již zmiňované podání α -GalCer vede k vymizení metastáz díky produkci IFN- γ a stimulaci NK i DC buněk. iNKT buňky se pravděpodobně uplatňují i v přirozeném imunitním dozoru nad nádorovým bujením v experimentálním modelu [130], [131].

Na druhou stranu ale výzkum na STAT-6^{-/-} myších (neschopných produkovat Th2 cytokiny IL-4 a IL-13) odhalil, že v některých experimentálních modelech brání iNKT buňky rejekci tumorů imunitním systémem prostřednictvím sekrece IL-13 a TGF- β [132]. Produkce IL-13 v kombinaci s TNF- α , vede totiž ke zvýšení sekrece TGF- β (myeloidní supresorovou buňkou - MDSC), což má za následek sníženou cytotoxickou aktivitu T lymfocytů [133].

Onkologičtí pacienti přesto byli prvními pacienty, na kterých byl v klinických studiích fáze 1 testován α -GalCer. Zatím nebylo dosaženo významného klinického efektu, ale tyto studie demonstrovaly, že podání α -GalCer vede i u lidí k signifikantní aktivaci vrozené i adaptivní imunity za výskytu minimálních nežádoucích účinků [67], [134].

2.2. iNKT buňky a autoimunitní onemocnění

První úvahy o úloze iNKT buněk v prevenci autoimunitních onemocnění pocházejí z devadesátých let z výzkumu na experimentálním modelu diabetu 1. typu (T1DM) - NOD (non obese diabetic) myši. Původní hypotéza asociace iNKT buněk s diabetem 1. typu zdůrazňovala, že iNKT buňky jsou prakticky jediným producentem IL-4 – cytokinu, který je nutný pro generaci Th2 odpovědi a jehož produkce je významně snížena u Th1 mediovaných autoimunitních onemocnění jako například T1DM [135], [136]. Tato úvodní hypotéza předpokládala, že v době rozvoje T1DM a některých dalších autoimunitních onemocnění existuje defekt iNKT buněk a tím i produkce IL-4, díky kterému autoreaktivní T-lymfocyty dozrávají v agresivní Th1 autoimunitní reakci. Pozorování na zvířecích modelech tuto teorii potvrdila. Nejpoužívanější zvířecí modely autoimunitních onemocnění NOD, lpr/lpr a další mají skutečně významně snížené množství (2-3x méně) iNKT buněk v periferních lymfatických orgánech [137].

2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu

Snížená množství iNKT buněk byla pozorována u experimentálních modelů diabetu 1. typu - NOD myši a BB krys. Reziduální populace NKT buněk NOD myši má navíc funkční poruchy - sníženou schopnost produkovat Th2 cytokiny – především již dříve zmiňovaný IL-4, ale i některé další [138], [139].

Vzhledem k mnoha podobnostem imunitního systému NOD myši a diabetiků 1. typu byla populace iNKT buněk opakovaně vyšetřována také u těchto diabetiků. První práce analyzovala in vitro expandované klony CD4⁻CD8⁻Vα24⁺ buněčné populace, která ovšem ne zcela přesně odpovídá iNKT buňkám. Wilson se spolupracovníky detekoval menší množství těchto klonů a porušenou schopnost produkovat IL-4 u

diabetiků 1. typu, čímž byly nepřímo potvrzeny výsledky z experimentálních modelů [140].

První práce, která přímo analyzovala iNKT buňky v periferní krvi diabetiků, potvrdila, že iNKT buňky diabetiků prvního typu neprodukuje IL-4 a je u nich porušená produkce i dalších cytokinů. Dále, stejně jako u zvířecích modelů diabetu 1. typu, popsala významnou redukci počtu iNKT buněk u recentních diabetiků 1. typu a jejich ICA⁺ příbuzných [141]. Tato práce byla později kritizována a ani jedna z několika dalších prací (včetně jedné české) nepotvrdila její výsledky – nebylo potvrzeno ani snížení počtu iNKT buněk ani porucha cytokinové sekrece u recentních diabetiků 1. typu [142]–[146]. Práce Berzina a spolupracovníků poukázala na zajímavou skutečnost - množství, fenotyp ani funkce iNKT buněk v periferní krvi nekorrespondují se stejnými parametry iNKT buněk v tkáních. Konkrétně v případě T1DM v pankreatických lymfatických uzlinách - orgánu klíčovém pro rozvoj i prevenci T1DM. Ani u NOD myši totiž nejsou nižší počty iNKT buněk v periferní krvi, ale především v pankreatických lymfatických uzlinách [147]. U lidí, kde je pochopitelně výzkum z etických důvodů omezen čistě na periferní krev, není snížení počtu iNKT buněk u diabetiků 1. typu detekovatelné.

V tomto směru jsou velice zajímavé výsledky ojedinelého projektu Haflerovy skupiny, která analyzovala pankreatické lymfatické uzliny diabetiků 1. typu odebrané při chirurgických zákrocích v dutině břišní nebo po smrti mozku kadaverózních diabetiků 1. typu. Klonování V α 24⁺ NKT buněk prokázalo, že tyto buňky pocházející z diabetiků 1. typu neprodukuje IL-4 [148].

Experimentální zvířecí modely přinesly přímý důkaz toho, že se iNKT buňky podílejí na udržování imunitní homeostázy a prevenci T1DM. Jedná se především o kompletní a většinou celoživotní prevenci T1DM dosaženou zvýšením počtu iNKT

buněk u rizikových zvířat genetickou manipulací (transgenezí) nebo buněčným transferem [138],[121]. Dále potom o experimenty se zvířaty, u kterých po selektivní genetické eliminaci iNKT buněk dojde k akceleraci T1DM (CD1d knock out NOD myši) [149],[150].

Několik výzkumných skupin nezávisle na sobě ukázalo, že podávání α -GalCer v časných fázích autoimunitní reakce vede k významnému snížení incidence diabetu u NOD myši a u většiny z nich k celoživotní prevenci T1DM. Po jeho podání dochází k zastavení autoimunitní reakce ve stadiu pouze lehké inzulitidy [150]–[152].

iNKT buňky brání vzniku diabetu tím, že inhibují jejich diferenciaci v Th1 profil. Nejedná se o deviaci těchto buněk v Th2 profil imunitní odpovědi, jak bylo původně předpokládáno, ale spíše o navození stavu hluboké neodpovídatosti – anergie. Autoreaktivní T lymfocyty v přítomnosti iNKT buněk neprodukují cytokiny ani Th1 ani Th2 profilu, nemigrují do pankreatických ostrůvků a neproliferují [153]. Oproti původním předpokladům nepoužívají iNKT buňky k této funkci cytokinů (ani IL-4), ale přímých mezibuněčných kontaktů s populací autoreaktivních Th1 lymfocytů v pankreatických lymfatických uzlinách [154]. Kontakty mezi oběma buněčnými populacemi jsou zprostředkovány dosud neidentifikovanou molekulární regulační dráhou nezávislou na CD1d [137].

Mechanismus prevence diabetu po podání α -Galactosylceramidu nebyl dosud zcela objasněn. Je jisté, že dochází k masivní expanzi iNKT buněk v pankreatických lymfatických uzlinách [152]. Regulace je pravděpodobně závislá na mezibuněčných kontaktech [154] a cytokinech - různé práce popisují roli IL-4 [155], IL-10 [152] nebo IL-13 – a interakci iNKT buněk s dalšími buněčnými populacemi jako jsou antigen prezentující buňky [156], [157] nebo CD4⁺CD25⁺ regulační T lymfocyty [158].

Objev α -Galactosylceramidu a jeho terapeutického potenciálu v experimentálním modelu T1DM jsou významným krokem k využití manipulace iNKT buněk v klinické praxi. Pro případné využití α -Galactosylceramidu argumentuje jeho účinnost v relativně pozdních fázích autoimunitní inzulitidy. Strategie je účinná, i pokud je zahájena v době počínající infiltrace pankreatických ostrůvků buňkami imunitního systému tzn. v době, kdy jsou již detekovatelné laboratorní známky autoimunity.

Kromě jedné studie s dvojitě transgenními myši [159] měla manipulace iNKT buněk pozitivní efekt na průběh diabetu ve všech ostatních studiích [137], [160]–[162], což slibovalo brzké klinické využití α -Galactosylceramidu k léčbě recentních diabetiků 1 typu. Přejít od preklinických k prvním klinickým testům byl donedávna brzděn především obavami z možných závažných nežádoucích účinků podání α -Galactosylceramidu.

Existují obavy z náhlého vyplavení velkých množství IL-4 a IL-13 a s tím spojeného rizika vzniku alergických onemocnění, snížení onkoimunosurveillance a další. Především u starších experimentálních zvířat byl pozorován po podání α -Galactosylceramidu vznik fatální jaterní léze [163]. Většina z obav byla rozptýlena fázemi I/II klinických zkoušek α -Galactosylceramidu u onkologických pacientů. Tyto studie ukázaly, že α -Galactosylceramid nemá významné nežádoucí účinky a i v poměrně vysokých dávkách je tato terapie lidskému organismu bezpečná. Nebylo pozorováno zvýšení jaterních testů, nevznikala alergická onemocnění a prakticky jediným nežádoucím účinkem byl mírný flu-like syndrom u některých pacientů [134],[67].

Terapii α -Galactosylceramidem lze snadno kombinovat s jinými imunosupresivními strategiemi [159] – například s bloádou kostimulačních drah - a tím ještě zlepšit terapeutické výsledky [164].

Velké naděje jsou nyní vkládány do vývoje glykolipidů, které specificky stimulují iNKT buňky. Změnou délky jejich řetězce je možné ovlivnit spektrum cytokinů produkovaných iNKT buňkami. Glykolipidy s kratším terminálním CH₃ řetězcem indukují sekreci především Th2 cytokinů [82] a v experimentálním modelu dosahují ještě lepších výsledků v prevenci diabetu než α -Galactosylceramid [165]. Vývoj těchto látek aktuálně probíhá v několika renomovaných laboratořích a lze od něj očekávat optimalizaci terapeutických výsledků a snížení nežádoucích účinků léčby.

2.2.2. Roztroušená skleróza

Lidské i experimentální onemocnění je způsobeno autoreaktivními myelin specifickými CD4⁺ lymfocyty, které demyelinizují výběžky neuronů a způsobují charakteristická ložiska demyelinizace v CNS. Defekt iNKT buněk u pacientů s RS a těch kmenů myší, u kterých lze snadno indukovat vznik onemocnění [166], [167], předpokládá, že iNKT buňky hrají roli v rozvoji onemocnění. Současný výzkum dosud roli iNKT buněk v rozvoji resp. prevenci onemocnění jednoznačně neobjasnil.

Onemocnění lze předejít zvýšením počtu iNKT buněk, ale jen u některých kmenů myší, a onemocnění má prakticky normální průběh i u myší bez iNKT buněk (CD1d^{-/-}) [168]–[170].

2.2.3. Systémový lupus erytematodes (SLE)

SLE je systémové autoimunitní onemocnění charakterizované produkcí širokého spektra autoprotilátek a multiorgánovým poškozením imunopatologickou reakcí 2. a 3. typu. Produkce autoprotilátek je závislá na pomoci CD1d a CD1c dependentních T lymfocytů u myši i lidí [171], [172].

Role iNKT buněk ve vzniku SLE není zcela jasná, experimentální modely produkují mnohdy zcela protichůdné výsledky. Pro protektivní roli iNKT buněk v SLE mohou svědčit jejich snížené počty u SLE myši nebo zlepšení lupusové dermatitidy podáním α -GalCer [173].

Jiné výzkumné skupiny pracující s jinými experimentálními modely ukazují, že blok iNKT buněk monoklonální protilátkou proti CD1d vede ke zlepšení klinického obrazu SLE a podání α -GalCer zhoršuje přežití myši. Nejsilnějším argumentem pro roli iNKT buněk v patogeneze onemocnění jsou experimenty, ve kterých transfer populace CD3^{int}NK1.1⁺ T lymfocytů obsahující iNKT buňky z myši s rozvinutým SLE indukuje glomerulonefritidu u zdravých recipientů [174].

2.3. iNKT buňky v protiinfekční imunitě

2.3.1 Obecná data a principy antimikrobního působení iNKT buněk

Díky svému cytotoxickému potenciálu, schopnosti produkovat cytokiny a ovlivňovat funkci dalších buněk, hrají iNKT buňky důležitou roli v imunitních reakcích proti různým infekčním agens [175], [176]. Přímým experimentálním důkazem jsou experimenty, v kterých myši bez iNKT buněk mají vyšší náchylnost nebo mortalitu některých infekcí. Dále pokusy, ve kterých stimulací iNKT buněk dojde k eradikaci infekce nebo zlepšení přežívání a v neposlední řadě také díky

experimentům, které in vitro demonstrují schopnost iNKT buněk rozpoznávat a reagovat na infekci [40].

Existují 3 mechanismy, kterými iNKT buňky rozpoznávají infekční agens.

1. Přímé rozpoznání invariantním TCR iNKT buněk. Tento mechanismus se uplatňuje především u bakterií. iNKT buňky tímto způsobem rozpoznávají například antigeny Sphingomonád, Borrelie Burdgorferi, Streptokoka pneumoniae, Helicobacteria pylori a některých parazitů jako Plasmodium falciparum, Trypanosomy, Leishmanie, ale také Mycobacterium Bovis (BCG). Antigeny všech těchto infekčních agens jsou zpracovány dendritickými buňkami a prezentovány CD1d molekulou iNKT buňkám. Není zcelá jasné, zda tento typ rozpoznání a stimulace iNKT buněk vyžaduje i současnou stimulaci TLR (Toll like receptor) [177].

2. Aktivace prostřednictvím cytokinů. Infekce E. coli, ale také experimentální podání LPS (lipopolysacharid), vedou k aktivaci iNKT buněk prostřednictvím TLR 4 a sekrece IL-12 a IL-18. Tyto molekulární dráhy aktivují iNKT buňky aniž by rozpoznaly tyto bakterie. Tento způsob aktivace je nezávislý na CD1d. Podobným způsobem (skrze TLR 9) aktivuje iNKT buňky i CpG (nemetylovaný CpG oligodeoxynukleotid), který je považován za „viral danger signal“ [177]. Aktivované iNKT buňky zvyšují produkci IFN- γ , který aktivuje další buněčné populace. Zvyšuje produkci IL-12 dendritickými buňkami, aktivuje virus specifické cytotoxické CD8 lymfocyty a aktivuje NK buňky. iNKT buňky dále simulují produkci I. typu interferonů plazmocytoidními dendritickými buňkami. Interferony I. typu inhibují replikaci virů a díky tomu je virová infekce eliminována i bez aktivace adaptivní

imunity. Tímto mechanismem se organismus pravděpodobně brání destrukci buněk splachnických orgánů infikovaných virem reakcí cytotoxických CD8+ lymfocytů [178]. Tento nepřímý mechanismus zajišťuje rychlou odpověď na různé mikroorganismy i přes svůj omezený TCR repertoár.

3. Kombinovaný způsob aktivace. Tento typ aktivace iNKT buněk byl objeven při experimentální infekci *Salmonella typhimurium* nebo *Staphylococcus aureus*. iNKT buňky ani jednu z těchto bakterií přímo nerozpoznávají, jsou aktivovány jimi indukovanými cytokiny. K plné aktivaci iNKT buněk je ale u obou těchto infekcí nutné rozpoznaní CD1d iNKT buňkami – pravděpodobně vlastních glykolipidů alterovaných touto infekcí. Podobným způsobem se iNKT buňky uplatňují i v imunitní reakci proti *Mycobacterium tuberculosis* [177].

2.3.2 Bakteriální infekce

Jak již bylo zmíněno, iNKT buňky se uplatňují v imunitní reakci proti celé řadě bakterií. První prezentovaná data byla na roli iNKT buněk v obraně proti mykobaktériím, na což má vliv jejich převážně glykolipidová struktura a závažnost infekce. Některé antigeny mykobaktérií jsou skutečně rozpoznávány lidskými iNKT buňkami [179]. Experimentální injekce purifikovaných mykobakteriálních antigenů myším vede k formaci granulomů bohatých na iNKT buňky [180] a u lidí jsou podobně detekovány iNKT buňky v lepromatozních lézích [181], což předpokládá roli iNKT buněk v obraně proti mykobakteriální infekci. Zdá se však, že alespoň u myši nejsou iNKT buňky k obraně proti mykobakteriální infekci esenciální. Infekce probíhá podobně u wild type a iNKT deficientních (*CD1d^{-/-}* či *Jα281^{-/-}*) myši [182].

V experimentech bylo prokázáno, že iNKT buňky, rozpoznávající přímo antigeny, se uplatňují v imunitní reakci i proti dalším bakteriím. Konkrétně se jedná o *Pseudomonas aeruginosa* a *Borellia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella choleraesuis*, *Sphingomonady*, *Borrelie Burdgorferi*, *Streptokoka pneumoniae*, *Helicobacteria pylori* [177], [183].

Bylo prokázáno, že bakteriální glykolipidy z *Borrelia burgdorferi* [184] a *Streptococcus pneumoniae* [185] jsou prezentovány CD1d molekulou a aktivují iNKT buňky přímo. V případě nepřítomnosti bakteriálního exogenního glykolipidu, jako např. u gram negativní infekce *Salmonella* [60], je aktivace iNKT zprostředkována vazbou iNKT a CD1d molekulou po navázání endogenního lipidového antigenu v kombinaci s působením cytokinů [183].

2.3.3 Infekce mykotické, infekce prvoky a parazity

Antigeny *Plazmodium falciparum* a *Trypanozoma cruzi* jsou rozpoznávány iNKT buňkami a iNKT buňky pravděpodobně hrají důležitou roli v imunitní reakci proti těmto patogenům, neboť signifikantní expanze iNKT je CD1d dependentní [186]. Podání α -GalCer navíc zvyšuje účinnost některých antimalarických vakcín. iNKT buňky se dále podílejí na imunitní reakci proti *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplazma gondii*, *Leishmania major* a *Schistosoma mansoni* [177], [183].

2.3.4 Virové infekce

2.3.4.1 Lidské virové infekce

Přesto, že viry neexprimují glykolipidy, iNKT buňky jsou zapojeny do antivirové odpovědi [187].

Bylo prokázáno, že po virové stimulaci TLR (Toll – like receptor) dojde ke zvýšení exprese povrchové molekuly CD1d. Toto zvýšení je jak na transkripční tak distribuční úrovni [188]. Zároveň však zablokování CD1d receptoru použitím protilátek u HSV infikovaných dendritických buněk neinaktivovalo iNKT odpověď [188]. Toto vede k hypotéze, že k optimální odpovědi iNKT buněk je zapotřebí současné působení cytokinů, které jsou produkovány během virové infekce.

Některé viry vyvinuly účinné obranné mechanismy, aby se vyhnuly prezentaci antigenu pomocí CD1d, což podporuje hypotézu o roli iNKT buněk v protivirové odpovědi a jejich CD1d závislou aktivaci. Některé viry snižují povrchovou expresi CD1d molekuly napadené buňky nebo její intracelulární zpracování, čímž se pravděpodobně snaží vyhnout rozpoznání CD1d závislými T lymfocyty včetně iNKT buněk.

Infekce Kaposi sarkoma associated herpes virus (KSHV) významným způsobem downreguluje povrchovou expresi CD1d [189].

Infekce herpes simplex virus typ I (HSV – I) vede k defektní CD1d prezentaci z endosomu na buněčný povrch [190].

Podobně i HIV – 1 downreguluje expresi CD1d molekuly její zvýšenou internalizací z buněčného povrchu a retencí v Golgiho komplexu [191]–[194].

Všechny tyto skutečnosti podporují teorii o CD1d závislé aktivaci iNKT při virové infekci, přestože viry neobsahují žádný exogenní lipidový antigen. Identifikace potenciálního endogenního lipidového antigenu a jeho regulace je dalším krokem k porozumění antivirové aktivity iNKT lymfocytů.

Další důkazy o roli iNKT buněk v protivirové imunitě pochází z klinických pozorování zvýšené náchylnosti iNKT deficientních pacientů k virovým infekcím. X-vázaný lymfoproliferativní syndrom může být způsoben mimo jiné mutací genu SAP

(signaling lymphocyte activation molecule – associated protein) nebo XIAP (X-linked inhibitor-of-apoptosis protein). Obě mutace vedou k funkčnímu poškození SLAM molekuly (Signaling lymphocyte activation molecule), která je důležitá pro spolupráci T a B lymfocytů a negativně ovlivňuje vývoj iNKT, což vede k deficienci iNKT buněk (XIAP selektivní, SAP neselektivní – zde zároveň T, B či NK lymfopenie) a vysokému riziku EBV infekce [195], [196]. Toto se přiklání k potvrzení hypotézy o protektivní roli iNKT proti EBV infekci.

I další primární imunodeficit vedoucí k nedostatku iNKT buněk (Wiskott-Aldrich syndrom) zvyšuje riziko EBV infekce [197]. Kazuistiky popisují další možné asociace. Například selektivní deficiencie iNKT buněk při těžké postvakcinační generalizované infekci herpes zoster [191],[198].

iNKT buňky představují i selektivní cíl virové infekce. Příkladem je HIV. HIV pozitivní pacienti mají významně redukovaná množství iNKT buněk v periferní krvi a množství CD4+ iNKT buněk negativně koreluje s virovou náloží [199]. Cílem HIV jsou CD4+ iNKT buňky, které vedle CD4 exprimují i další cíl HIV – CCR5 receptor [200].

iNKT buňky se vyskytují v poměrně vysokých frekvencích v játrech a v průběhu infekce hepatotropními viry na nich lze detekovat morfologické i funkční změny. iNKT buňky expandují v játrech pacientů v chronické fázi virových hepatitid. Jsou aktivovány a produkují zvýšená množství Th2 cytokinů IL-4 a IL-13. Zvýšená produkce těchto profibrotických cytokinů v době progresu hepatitidy v cirhózu naznačuje, že iNKT buňky mohou hrát u chronických virových hepatitid roli v patogenezi onemocnění [201], [202].

Roli iNKT buněk v protivirové imunitě lze demonstrovat také na klinickém zlepšení při léčbě α -GalCer při infekci virem HIV [203], MCMV [204], RSV [205], hepatitis B (HBV) [206] a infekcí virem influenza [207].

2.3.4.2 iNKT buňky v experimentálních modelech virových infekcí

1. **MCMV** (myší cytomegalovirus). Experimenty s $J\alpha 281^{-/-}$ a $CD1d^{-/-}$ myši ukazují na roli $CD1d$ dependentních T lymfocytů v imunitní reakci proti MCMV (vyšší mortalita $CD1d^{-/-}$, ale ne $J\alpha 281^{-/-}$) než u myši s normálními počty iNKT buněk. iNKT buňky jsou v průběhu MCMV infekce aktivovány a produkují IFN- γ . Prostřednictvím IFN- γ je aktivován cytotoxický potenciál NK buněk, vedoucí k lýze virem infikovaných buněk. U MCMV vede injekce α -GalCer k aktivaci NK buněk prostřednictvím IFN- γ produkovaného iNKT buňkami. NK buňky jsou hlavní efektorovou populací imunitní reakce proti MCMV [208], [209].
2. **EMCV** (diabetogenní encephalomyocarditis virus). $CD1d$ deficientní myši vykazují těžší průběh virové infekce s paralýzami a vyšší mortalitou než wild typ myši. Na celulární úrovni vykazují $CD1d^{-/-}$ myši zhoršenou produkci cytotoxických cytokinů $CD4$ a $CD8$ lymfocyty. I u EMCV modelu vede jedna injekce α -GalCer k prevenci klinických projevů EMCV – myokarditis, encefalitis a diabetu [210].
3. **CVB** (coxsackie virus B3). K rozvoji onemocnění v experimentálním modelu (myokarditis) je nutná exprese $CD1d$, myocyty jsou destruovány $CD1d$ dependentní populací $V\gamma 4^+$ T lymfocytů, ale ne iNKT buňkami [211].
4. **LCMV** (lymphocytic choriomeningitis virus). LCMV napadá iNKT buňky a indukuje jejich apoptotickou smrt [212]. Infekce LCMV je kontrolována

především cytotoxickými T lymfocyty [213]. iNKT buňky hrají důležitou roli v eliminaci infekce LCMV v pankreatu. U LCMV modelu vede injekce α -GalCer k signifikantnímu snížení množství kopií viru v pankreatu. Po injekci α -GalCer stimulují aktivované iNKT buňky plazmocytoidní dendritické buňky k lokální produkci interferonů typu 1, které mají antivirovou aktivitu [178].

5. **RSV** (respiratory syncytial virus). Imunitní reakce proti tomuto RNA viru je zprostředkována cytotoxickými CD8 lymfocyty, experimenty na CD1d^{-/-} myších naznačují, že iNKT buňky jsou nepostradatelné pro jejich expanzi a produkci IFN- γ . CD1d^{-/-} myši mají opožděnou a zhoršenou eliminaci viru RSV. Podání α -GalCer zlepšuje klinický průběh infekce RSV virem pravděpodobně expanzí cytotoxických CD8⁺ lymfocytů a NK buněk.
6. **Influenza A**. CD1d deficientní myši vykazují horší průběh infekce tímto RNA virem a vyšší mortalitu. iNKT buňky redukují počet imunosupresivních MDSC (myeloid-derived suppressor cells), které v podmínkách influenzové infekce inhibují specifické cytotoxické CD8 T lymfocyty. Podání α -GalCer redukuje množství kopií viru influenzy a zlepšuje klinické projevy infekce tímto virem díky stimulaci vrozené imunity [214].

2.3.4.3 Role iNKT buněk v postvakcinačních imunitních odpovědích proti virům

Současné podání atenuovaného viru (např. influenzy) a α -GalCer zvyšuje produkci virus specifických protilátek a aktivitu virus specifických cytotoxických CD8⁺ lymfocytů. Tyto imunologické změny provokované současným podáním α -GalCer se promítají do zlepšeného přežívání po následném podání viabilního viru [215].

3. iNKT buňky a herpesviry

3.1. Taxonomie a struktura herpesvirů

Současná klasifikace řádu Herpesvirales definuje tři čeledi – herpesviridae, alloherpesviridae a malacoherpesviridae. Pouze čeleď herpesviridae obsahuje savčí viry. Příslušníci čeledě alloherpesviridae infikují ryby a žáby a členové čeledě malacoherpesviridae infikují škeble [216].

Čeleď Herpesviridae zahrnuje viry, které infikují savce, plazy a ptáky a podle vlastností virů ji můžeme rozdělit na 3 podčeledi. Osm herpesvirů, které mohou infikovat člověka, jsou součástí všech tří podčeledí. Herpes simplex virus 1, herpes simplex virus 2 a varicella-zoster virus patří mezi alfaherpesviry, lidský cytomegalovirus, herpesvirus 6 a lidský herpesvirus 7 patří mezi betaherpesviry a Epstein-Barr virus a Kaposi sarkoma asociovaný herpesvirus patří mezi gamaherpesviry.

Obrázek 5: Přehled lidských herpesvirů [217]

Type	Synonym	Subfamily	Pathophysiology
HHV-1	Herpes simplex virus-1 (HSV-1)	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Oral and/or genital herpes (orofacial)
HHV-2	Herpes simplex virus-2 (HSV-2)	α (alpha)	Oral and/or genital herpes (genital)
HHV-3	Varicella zoster virus (VZV)	α (alpha)	Chickenpox and Shingles
HHV-4	Epstein-Barr virus (EBV) Lymphocryptovirus	<i>Gammapherpesvirinae</i> γ (gamma)	Infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, CNS lymphoma (in AIDS patients), post-transplant lymphoproliferative syndrome (PTLD), nasopharyngeal carcinoma
HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	<i>Betaherpesvirinae</i>	Infectious mononucleosis-like syndrome, retinitis, etc.
HHV-6, 7	Roseolovirus	β (beta)	Roseola infantum or <i>exanthem subitum</i>
HHV-8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), a rhabdovirus	γ (gamma)	Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, some multicentric Castleman's disease

Herpesviry jsou obalené dvouvláknové DNA viry. Replikují se v jádře infikované buňky a je pro ně typické přežívání v tkáních v latentním stavu.

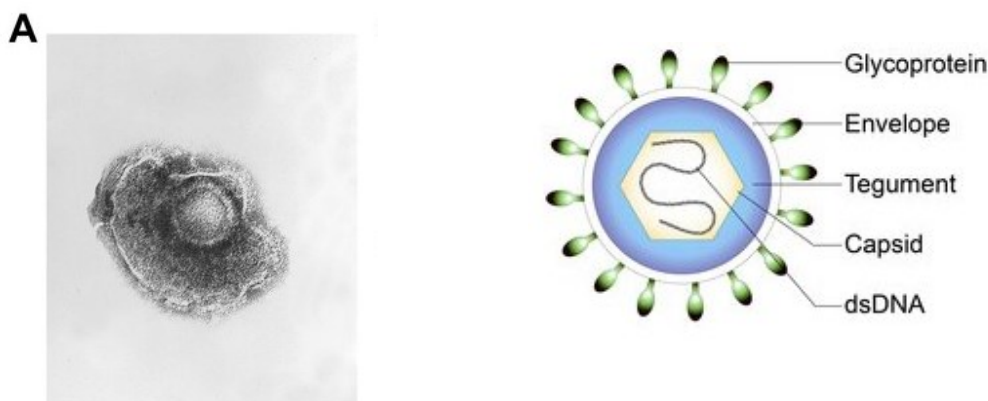
Všechny lidské herpesviry mohou způsobit vážné patologie. Infekce alfa herpesviry může vést k potenciálně letální encefalitidě, infekce lidským cytomegalovirem může způsobit závažné patologie prakticky jakéhokoliv orgánu především u imunokompromitovaných jedinců a oba příslušníci podčeledi gama herpesvirů (Epstein-Barr virus a Kaposhi sarkoma associated herpesvirus) jsou spojováni se vznikem malignit.

Analýza genetické informace herpesvirů ukazuje, že se vyvinuly už před 180-220 miliony let. Za tuto dobu herpesviry vyvinuly celou řadu strategií, jak uniknout detekci a zničení imunitním systémem. Jedním z mechanismů je produkce proteinu homologního s lidským IL-10, který inhibuje prozánětlivé cytokiny (IFN- γ , IL-1 α , GM-CSF, IL-6 a TNF- α), jiná strategie snižuje expresi MHC I a MHC II infikované buňky. Velká část virové genetické informace kóduje právě tyto schopnosti. Důkazem úspěchu těchto mechanismů je perzistence viru v lidských tkáních. Tato perzistence je po většinu života klinicky asymptomatická, k reaktivaci herpetické infekce dochází pouze v době oslabení imunitního systému.

Obrázek 6 [218]

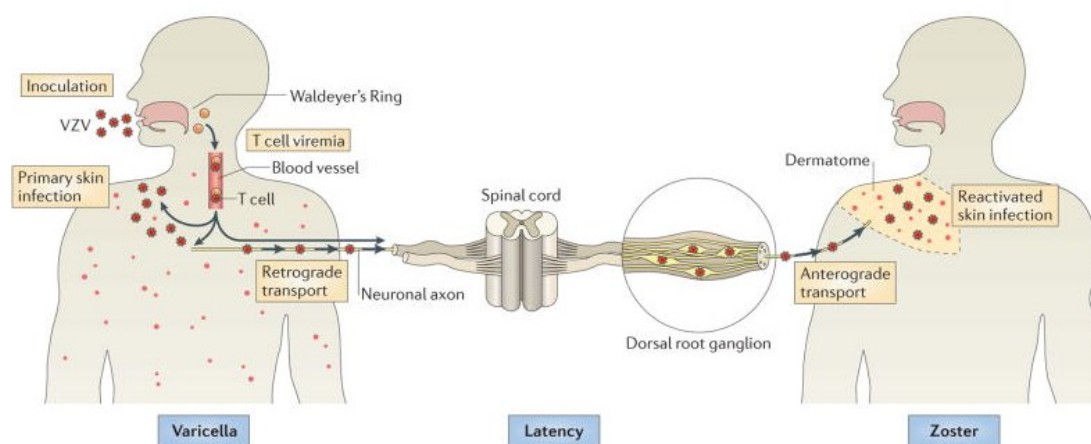
(A) VZV v elektronovém mikroskopu.

(B) Schéma VZV.



Obrázek 7 [219]

Životní cyklus VZV. VZV se šíří převážně kapénkovou cestou. Primárním vstupem infekce jsou epitelie dýchacích cest. Záhy dochází k šíření krevní a lymfatickou cestou. Tato primární infekce probíhá jako plané neštovice. Primární infekce je následována obdobím latence, kdy VZV přetrvává v neuronech dorzálních ganglií. V tomto období nedochází k replikaci viru ani k poškození hostitelských neuronů. Může dojít k reaktivaci viru, kdy se VZV začne uvnitř ganglia sekundárně replikovat a šíří se sensorickým nervem do příslušných kožních dermatomů, kde vyvolá typickou bolestivou vyrážku – pásový opar [219].



3.2. Imunitní reakce proti herpesvirům

První linií obrany proti virům je vrozená imunita, která má za úkol zabránit počátečním fázím infekce a zároveň omezuje šíření viru. Všechny buňky infikované virem produkují $\text{IFN-}\alpha$ a $\text{INF-}\beta$ jako odpověď na přítomnost dvouvláknové RNA, která vzniká v určité fázi životního cyklu všech virů. Tyto interferony mají 3 hlavní funkce. Indukcí syntézy enzymů ve zdravých i infikovaných buňkách dokáží zastavit replikaci viru. Nejvíce prozkoumaným enzymem je enzym PKR (RNA-dependentní

protein kináza). PKR fosforyluje iniciační faktor proteosyntézy, který je tímto inaktivován a dojde k inhibici syntézy proteinů v buňce (včetně virových). Dalším enzymem je 2-5A syntetáza (2,5 – oligoadenylát syntetáza), ta v odpovědi na interferony 1. typu aktivuje ribonukleázy štěpící virovou RNA [220].

Druhou důležitou funkcí IFN- α a INF- β je indukce exprese MHC I.třídy na většině buněk v těle, čímž zvyšuje jejich rezistenci k NK buňkám. K tomuto zvýšení dochází i na buňkách nově infikovaných virem, čímž je činí více náchylné k CD8+ cytotoxickým T lymfocytům. Třetí funkcí je aktivace NK buněk, které následně selektivně likvidují virem infikované buňky [221], [222].

Druhá linie nespecifické obrany organismu je představována komplementovým systémem, který je v případě virů aktivován vazbou C1 na komplex Ag-Ig. Dále se významně uplatňuje fagocytóza virů. Infikované makrofágy a dendritické buňky produkují IL-12, silný aktivátor NK buněk, a aktivují cytotoxické T lymfocyty. Klasické NK buňky hrají důležitou roli v protivirové obraně. Aktivované NK buňky jsou důležitým producentem IFN- γ . Tento IFN- γ je klíčovým cytokinem při kontrole virové infekce před aktivací T lymfocytů, které následně produkci IFN- γ přebírají [223].

Ve specifické protivirové obraně jsou účinným nástrojem protilátky. IgA blokuje adhezi virů na epitel. V tělních tekutinách se uplatňují IgM a IgG – neutralizují vstup virů do buněk, opsonizují je pro fagocyty a aktivují komplement.

Důležitá je i buněčná imunita. Efektorovou buňkou buněčné specifické imunity v protivirové obraně je CD8+ lymfocyt (CTL). Efektorové Tc ničí v přímém kontaktu infikované buňky jako potenciální zdroj infekce.

3.3. iNKT buňky v experimentálních studiích s alfa-herpesviry

Myši bez iNKT buněk ($J\alpha 281^{-/-}$ a $CD1d^{-/-}$) mají těžší průběh herpetické infekce (HSV-1 a HSV-2) a zhoršenou clearance viru než myši s normálními počty iNKT buněk [224], [225]. Výsledky studií se liší v závislosti na virulenci a kvantitě použitého viru. Některé studie ukazují, že spíše než iNKT buňky se v imunitní reakci proti HSV-1 uplatňují jiné CD1d závislé T lymfocyty [226]. Další studie neprokázaly žádný rozdíl v klinickém průběhu infekce mezi iNKT deficientními a suficientními myšmi [227].

3.4. Data o roli iNKT buněk v imunitní reakci proti lidským herpesvirům

Data o roli iNKT buněk v imunitní reakci proti herpesvirům jsou omezena na jednu jedinou kazuistiku z roku 2003, která popisuje rozvinutí diseminované život ohrožující infekce VZV u 11leté dívky 5 týdnů po podání očkovací látky, která obsahovala živý oslabený virus varicella zoster. Konkrétně se jednalo o vakcinaci kmenem Oka. Tato pacientka měla v anamnéze časté virové infekce (congenitální CMV, výrazně zvýšený titr protilátek proti herpesvirům a časté respirační infekty). Podrobná imunologická analýza neprokázala žádné známé vysvětlení její zvýšené citlivosti k podané vakcíně. Jedinou prokázanou abnormalitou byl těžký deficit iNKT buněk – funkční i kvantitativní [198].

HYPOTÉZA

Kromě NK a T lymfocytů se kontroly proti lidským herpesvirům účastní i iNKT.

Hypotézu, že se iNKT buňky uplatňují v imunitní reakci proti lidským herpesvirům, jsme vytvořili na základě několika již dříve zmíněných faktů:

1. Rod herpesvirů downreguluje expresi CD1d, čímž se pravděpodobně snaží uniknout mechanismu, který vede k prezentování antigenů pomocí CD1d iNKT lymfocytům [191].
2. Grubor – Bauk [224] a Ashkar [225] popsali v experimentálním modelu zvýšenou incidenci herpetických infekcí u myši, které nevytváří iNKT lymfocyty (CD1d^{-/-}).
3. Kazuistika 11leté dívky z roku 2003, která popisuje rozvinutí diseminované život ohrožující infekce VZV 5 týdnů po podání očkovací látky, obsahující živý oslabený virus varicella zoster. Jedinou prokázanou abnormalitou byl deficit iNKT lymfocytů [198].

Položili jsme si několik otázek:

- Mění iNKT buňky množství v době akutní exacerbace herpetické infekce? Je rozdíl v množství iNKT buněk mezi pacienty s jednou epizodou herpetické infekce a opakovanými exacerbacemi? Druhý bod je aplikovatelný pouze na infekci herpes zoster, kde reaktivace v podobě pásového oparu jsou klinicky jednoznačné na rozdíl od opakovaných infekcí herpes simplex.

- Mění iNKT buňky fenotyp nebo funkci (kapacitu produkovat cytokiny) v době akutní exacerbace herpetické infekce?
- Jakým mechanismem se iNKT podílejí na kontrole alfa herpesvirové infekce? Jedná se o mechanismus závislý na produkci cytokinů po TCR stimulaci nebo se naopak iNKT buňky chovají jako NK buňky a jsou tudíž stimulovány nespecifickými signály jako CpG (nemetylovaný CpG oligodeoxynukleotid) a reagují pouze změnou exprese inhibičních a aktivačních receptorů?



Rapid Communication

Low numbers and altered phenotype of invariant natural killer T cells in recurrent varicella zoster virus infection

Lucie Novakova^a, Agnes Lehuen^b, Jan Novak^{a,*}

^aThird Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

^bINSERM U986, Hôpital Cochin, St. Vincent de Paul, Université Paris Descartes, 82 Avenue Denfert Rochereau, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2010

Accepted 18 April 2011

Available online 23 April 2011

Keywords:

iNKT cells

Varicella zoster virus

NK cells

Natural killer receptors

ABSTRACT

Invariant natural killer T (iNKT) cells play an important role in the immune response against various infectious agents. In this study we investigated their role in human defense against the varicella zoster virus. We observed decreased numbers of iNKT cells in patients who failed to control latent varicella zoster virus infection, e.g. underwent several reactivations of the virus. The residual population of iNKT cells expressed significantly higher levels of inhibitory receptor CD158a that was further up-regulated in the course of acute viral infection. Both of these abnormalities might contribute to impaired control of varicella zoster virus in human.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Both innate and adaptive immunity are involved in the defense against varicella zoster virus (VZV). The initial response of naïve host is mediated by the innate immune system through antiviral cytokines and NK cells. The acquisition of virus-specific T cells appears to be necessary to prevent disseminated infection [1]. In this work, we hypothesized that in addition to NK and T cells, iNKT cells might be involved in the control of VZV. iNKT cells are CD1d dependent natural killer-like T cells. These cells are often called unconventional T cells since they differ in several ways from mainstream T cells, such as in the co-expression of NK markers, restriction by CD1d molecule, expression of highly restricted TCR or potential to produce rapidly large amounts of cytokines [4,6]. iNKT cells are involved in the responses to viruses although unlike bacteria and parasites, viruses contain only host lipids. Several mouse and human viruses including viruses of the Herpes family down-regulate CD1d expression, suggesting a viral immune evasion mechanism that prevents CD1d-mediated antigen presentation to iNKT cells [8]. There is not enough data on the role of iNKT cells in the defense against VZV in experimental models. However, works of Grubor-Bauk [9] and Ashkar [2] described increased susceptibility of mice lacking iNKT cells to infection with viruses of the Herpes family. CD1d^{-/-} and α 281^{-/-} mice exhibit impaired

clearance and more florid acute infection with herpes simplex type 1 virus [9] and the resistance of CD1d^{-/-} mice to herpes simplex type 2 virus is significantly impaired in comparison to wild type mice [2]. In addition to experimental studies, a case-report published by Levy and co-workers presents the case of 11-year-old girl who developed severe disseminated life-threatening infection five weeks after receiving attenuated vaccine strain of VZV. The analysis of lymphocyte subsets revealed profound, isolated deficiency of iNKT cells [12].

2. Material and methods

2.1. Patients' characteristics

Two groups of individuals were recruited. The first group consisted of patients who failed to control VZV, e.g. developed multiple VZV reactivations during their life (referred as VZV patients). VZV patients: $n = 52$, median age 59.4 years, 20 males, 32 females. The median time between the last manifestation and our analysis was 1216 days. The patients were recruited from the Department of Dermatovenerology of the Teaching Hospital Kralovske Vinohrady, Department of the Infectious Diseases of the Hospital Jihlava, Department of Dermatology of the Hospital Jihlava. Patients with known diagnosis of immunodeficiency, autoimmune diseases or cancer were excluded from the study.

The second group consisted of individuals who have controlled the VZV infection (referred to as controls), e.g. experienced only a single VZV manifestation in childhood (chickenpox); ($n = 40$). The groups were matched by age and sex.

* Corresponding author. Address: Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Centre of Research for Diabetes, Endocrinological Diseases and Clinical Nutrition, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic. Fax: +420 26716 3058.

E-mail address: novakjan@centrum.cz (J. Novak).

The analysis of iNKT cells during acute reactivation of VZV was performed on 14 patients. We analyzed their blood twice; at first when the first specific symptoms appeared and then again when the infection resolved (9.5 days in average; 5–22 days). These 14 patients (data from second time point) were included in the group of 52 VZV patients mentioned above.

Diagnosis of VZV infection was based on typical clinical features and was confirmed by PCR in indicated cases.

All patients signed informed consent approved by local ethical authorities.

2.2. Surface staining

Fresh peripheral blood was analysed by flow cytometry. Surface staining was performed with the following mAbs: anti-6B11 (6B11), anti-CD56 (C5.9 and N901/NKH-1), anti-V γ 9 (IMMU 360), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD158a (HP-3E4), anti-CD161 (DX12), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-NKG2A (131411), anti-NKG2D (149810), anti-CD8 (B9.11). Cell populations were identified as follows: iNKT cells: 6B11⁺CD3⁺, NK cells: CD56⁺CD3⁻, T cells: CD56⁻CD3⁺.

2.3. Intracytoplasmic staining

Intracytoplasmic staining was performed as described elsewhere [3] using the following conjugated mAbs: anti-IFN- γ (45.15), anti-TNF- α (IPM2/188), anti-IL-4 (4D9), anti-IL-13 (32007). Monoclonal antibodies were purchased from BD Pharmingen, Immunotech, Sigma – Aldrich and RDSystems – BIOMEDICA.

Cells were acquired with a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using CELLQUEST software.

2.4. Statistical analysis

The data was analyzed using unpaired Student's T-test.

3. Results

3.1. Immune system of VZV patients

We first analyzed the proportions of T and NK cell populations in fresh peripheral blood lymphocytes. We did not detect significant difference in the proportion of CD3⁺, CD3⁻CD56⁺ or CD3⁺CD56⁻ cells among lymphocytes, nor in the proportion of CD4⁺ to CD3⁺ cells or of CD56^{bright} to CD56⁻ cells (Fig. 1a–e) between VZV patients and controls. Importantly, the proportion of 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells was significantly lower ($p = 0.01$, unpaired Student's T-test) in VZV group (0.06% mean, 0.01 median) than in controls (0.12% mean, 0.05 median) (Fig. 1f).

3.2. iNKT cells in VZV patients

The main iNKT cell subpopulations (CD4⁺ and CD4⁻CD8⁻) were uniformly distributed in both groups (Fig. 1g and data not shown). Similarly, we did not detect differences in the expression of T and NK cell markers (CD25, CD161, and NKG2D) on iNKT cells (Fig. 1g) between both groups. Contrarily, CD158a (KIR2DL1), the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), was preferentially expressed on iNKT cells from VZV patients (27.57% versus 13.34% mean of positive cells, $p = 0.001$) (Fig. 1g).

The intracytoplasmic measurement of cytokine secretion after in vitro stimulation revealed that iNKT cells from both groups produced similar quantities of both Th1 (IFN- γ , TNF- α) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-13) (Fig. 1h).

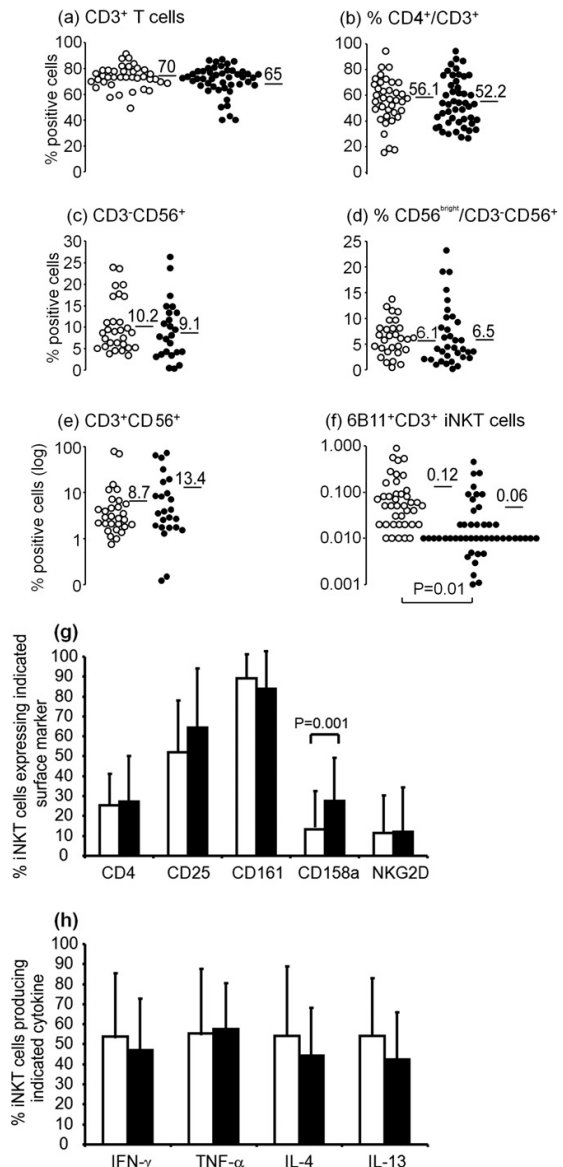


Fig. 1. iNKT cells in VZV patients. (a–e) Frequency of indicated T and NK populations among lymphocytes in peripheral blood of VZV patients (black dots) and controls (white dots). Each dot corresponds to an individual patient. Values indicate the mean of positive cells. (g) Expression of indicated T and NK surface markers on and (h) intracytoplasmic cytokine content in 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells after in vitro re-stimulation in VZV patients (black bars) ($n = 52$) and controls (white bars) ($n = 40$). Data corresponds to the (g) mean of cells expressing indicated surface marker or (h) producing indicated cytokine. Error bars indicate the standard deviation.

3.3. iNKT cells in VZV patients during acute VZV reactivation

To gain more insight into the role of iNKT cells in the defense against VZV, we analyzed phenotype of and cytokine secretion by iNKT cells during acute reactivation of VZV. Parameters measured during acute infection were compared with data obtained after the resolution of acute infection (9.5 days from the beginning of the infection in average).

The population of iNKT cells underwent significant changes during acute VZV infection. Although we did not detect expansion of iNKT cells (Fig. 2a), their subpopulations (Fig. 2c) or changes in the cytokine production by iNKT cells (Fig. 2d), we noticed, however, changes in the expression of surface NK markers (Fig. 2c). Notably CD158a expression on iNKT cells was enhanced (29.61% versus 18.97% mean of positive cells and 150.94 versus 131.76 mean of MFI during acute infection and in steady state, respectively) (Fig. 2c and data not shown). NKG2D was also up-regulated on iNKT cells during acute infection in some patients (31.5% versus 19.6% mean of positive cells during acute infection and steady state, respectively) the average, however, did not reach the statistical significance (Fig. 2c). The up-regulation of NKG2D was not restricted to iNKT cells; we observed similar tendency on classical NK cells, CD3⁺CD56⁺ and V γ 9 T cells in some patients (data not shown).

4. Discussion

Our work describes a correlation between low iNKT cell numbers and multiple reactivations of VZV infection. The design of

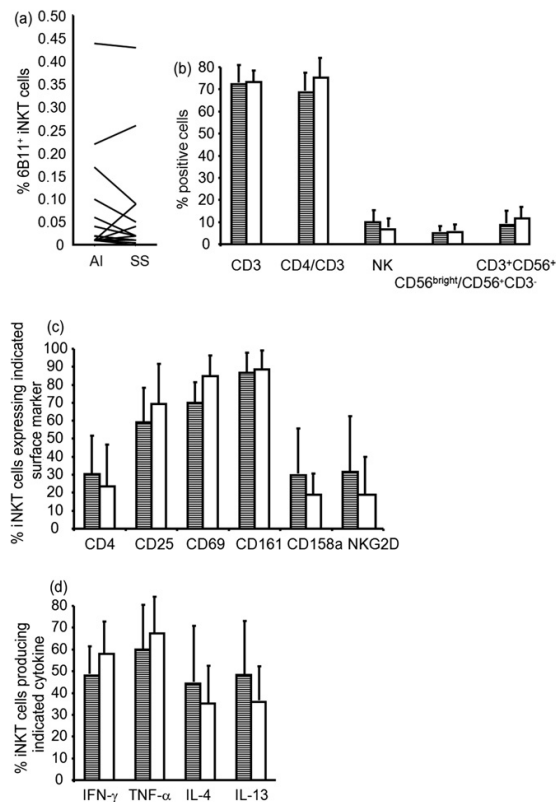


Fig. 2. iNKT cells in VZV patients during acute VZV reactivation. (a) Frequency of 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells in peripheral blood of VZV patients during acute reactivation of VZV infection (point AI) versus steady state (point SS). Each line between AI and SS point corresponds to an individual patient ($n = 14$). (b) Frequency of indicated T and NK populations among lymphocytes in peripheral blood of VZV patients during acute reactivation of VZV infection (stripped bars) versus steady state (white bars). (c) Expression of indicated T and NK surface markers on 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells and (d) intracytoplasmic cytokine content in 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells after in vitro re-stimulation in VZV patients during acute reactivation of VZV infection (stripped bars) and in steady state (white bars). The values indicate the mean of cells (b,c) expressing indicated surface marker or (d) producing indicated cytokine. Error bars indicate the standard deviation.

our work did not allow to unambiguously determine if abnormally low iNKT cell number establishes the cause or effect of VZV infection. VZV infection can potentially induce the decline of iNKT cell numbers through various mechanisms. iNKT cells might down-regulate their surface markers upon activation and escape detection [16]. Alternatively, iNKT cell numbers in peripheral blood can be reduced by direct depletion of iNKT cells by the virus itself, or relatively reduced by the expansion of VZV - specific conventional lymphocytes, by the relocation of iNKT cells from peripheral blood to the site of inflammation, etc. In all of these cases one would expect gradual expansion of iNKT cell compartment following the resolution of acute VZV infection. This was not the case. The proportion of iNKT cells was identical in two groups of VZV patients; patients who had last manifested VZV less than one year and patients who had last manifested VZV more than one year before our analysis (Fig. 3).

Contrarily, low iNKT cell numbers encoded genetically [11] might be the cause of recurrent VZV infection. The precise mechanism of potential control of VZV by iNKT cells remains to be revealed. Our findings of unimpaired cytokine production by iNKT cells in VZV patients and their unchanged profiles during acute VZV infection (Figs. 1h and 2d) argue against a key role of studied cytokines.

The antiviral activities of iNKT cells might be mediated by NKG2D, an activating NK receptor that is required for NK cell mediated resistance to many viruses [10]. We did not detect defects in the expression pattern of NKG2D on iNKT cells of VZV patients in steady state (Fig. 1g). There was however, an obvious trend to up-regulate NKG2D during acute reactivation of VZV on iNKT cells as well as on other cell types. In none of these populations the up-regulation of NKG2D overcame statistically significant level ($p = 0.06$ for NK cells, $p = 0.09$ for iNKT cells, $p = 0.10$ for T cells) (data not shown).

In addition to the direct effect of iNKT cells on VZV-infected cells, iNKT cells might contribute to the clearance of VZV indirectly, by promoting the function of other cell types. The cooperation of iNKT cells with classical NK cells is an obvious candidate of such type of cooperation given a well established role of NK cells in the defense against VZV infection [5]. Finally, iNKT cells might promote the differentiation of virus-specific T and B cells and subsequent production of virus-specific antibodies.

In addition to their decreased numbers, iNKT cells of VZV patients exhibit phenotypical abnormalities in steady state, particularly CD158a up-regulation (Fig. 1g). CD158a belongs to the killer cell immunoglobulin-like receptors that mediate inhibitory signals provided by the recognition of MHC class I molecules to NK cells. The KIR repertoire is determined genetically; primarily by the KIR genotype (KIR genes are located on human chromosome 19) and subtly by HLA genotype [14]. In addition to NK cells, CD158a is expressed by various populations of T cells, including both TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$ T cells. Simultaneous signaling by TCR and

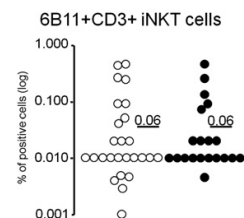


Fig. 3. iNKT cells in VZV patients – follow-up. Frequency of iNKT cells in patients who had last manifested VZV less than one year (white dots) and patients who had last manifested VZV more than one year before our analysis (black dots). Each dot corresponds to an individual patient. Values indicate the mean of positive cells.

CD158a alters activation via TCR and impairs T cell function [13]. One can speculate that a genetically determined pattern of CD158a expression in VZV patients may impair the function of iNKT cells and thus contribute to impaired control of VZV.

Alternatively, CD158a expression pattern might be the consequence of VZV infection. CD158a is up-regulated in chronic inflammatory processes such as GVHD [15]. The exposure to cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) in vitro also up-regulates CD158a [7]. Enhanced CD158a expression on iNKT cells thus might be induced by immune response against VZV.

The real impact of CD158a up-regulation on impaired clearance of VZV remains to be elucidated. One should be reminded that both inhibitory (CD158a) and activating (NKG2D) receptors were up-regulated in similar extent on iNKT cells in VZV infection (a similar phenomenon was observed in vitro upon IL-2, IL-7 and IL-15 exposure) [7]. The up-regulation of CD158a might not necessarily lead to impaired immune response to VZV. Instead, the modulation of both activating and inhibitory NK receptors might optimize the threshold of immune responses dependent on NK receptor signaling.

In conclusion, our work describes quantitative and qualitative abnormalities of the population of iNKT cells in recurrent VZV infection patients suggesting the involvement of iNKT cells in the control of VZV.

Acknowledgments

We are very grateful to Vaclava Kolarikova for her excellent technical help, to Ladislav Benda (Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague) for statistical analysis and to Adrianna Frank (3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague) for English corrections. We thank Jiri Pavlicek (Czech Academy of Science) for critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Jan Lippert and Dr. Spiros Gkalkpakioitis from Department of Dermatovenerology Teaching Hospital Kralovske Vinohrady, Dr. Zuzana Nevoralova and Dr Stefan Duban from the Department of Dermatology of the Hospital Jihlava, Dr. Josef Skarek from the Department of the Infectious Diseases of the Hospital Jihlava and Marie Novakova from Hospital Jihlava for patient's recruitment. We thank Vojtech Novak for help with figures. The work was supported by the grant MSM 0021620814.

References

- [1] A.M. Arvin, Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview, *J. Infect. Dis.* 197 (Suppl 2) (2008) S58–S60.
- [2] A.A. Ashkar, K.L. Rosenthal, Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection, *J. Virol.* 77 (2003) 10168–10171.
- [3] L. Beaudoin, V. Laloux, J. Novak, B. Lucas, A. Lehen, NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells, *Immunity* 17 (2002) 725–736.
- [4] A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton, The biology of NKT Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 297–336.
- [5] C.A. Biron, K.S. Byron, J.L. Sullivan, Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells, *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 1731–1735.
- [6] M. Brigi, M.B. Brenner, CD1: antigen presentation and T cell function, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 817–890.
- [7] V. Decot, L. Voillard, V. Laiger-Cannard, L. Aissi-Rothe, P. Perrier, J.F. Stoltz, D. Bensoussan, Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression, *Exp. Hematol.* 38 (2010) 351–362.
- [8] J. Diana, A. Lehen, NKT cells: friend or foe during viral infections?, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 3283–3291.
- [9] B. Grubor-Bauk, A. Simmons, G. Mayrhofer, P.G. Speck, Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR, *J. Immunol.* 170 (2003) 1430–1434.
- [10] L.L. Lanier, NKG2D in innate and adaptive immunity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 560 (2005) 51–56.
- [11] P.T. Lee, A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P.A. Gottlieb, A. Bendelac, Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 793–800.
- [12] O. Levy, J.S. Orange, P. Hibberd, S. Steinberg, P. LaRussa, A. Weinberg, S.B. Wilson, A. Shaulov, G. Fleisher, R.S. Geha, F.A. Bonilla, M. Exley, Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 948–953.
- [13] M.C. Mingari, M. Ponte, C. Vitale, R. Bellomo, L. Moretta, Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function, *Hum. Immunol.* 61 (2000) 44–50.
- [14] H.G. Shilling, N. Young, L.A. Guethlein, N.W. Cheng, C.M. Gardiner, D. Tyan, P. Parham, Genetic control of human NK cell repertoire, *J. Immunol.* 169 (2002) 239–247.
- [15] J. Tanaka, A. Mori, S. Ohta, Y. Yamamoto, S. Kobayashi, S. Hashino, M. Kobayashi, M. Asaka, M. Imamura, Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation, *Br. J. Haematol.* 108 (2000) 778–783.
- [16] M.T. Wilson, C. Johansson, D. Olivares-Villagomez, A.K. Singh, A.K. Stanic, C.R. Wang, S. Joyce, M.J. Wick, L. Van Kaer, The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 10913–10918.

Materiál a metoda (VZV):

Pacienty jsme rozdělili do 2 skupin. První skupina zahrnovala pacienty, kteří špatně kontrolují infekci VZV. Během života u nich došlo k opakovaným reaktivacím VZV v podobě pásového oparu. Skupina měla 52 pacientů (20 mužů a 32 žen), věkový medián 59,4 roky. Medián mezi poslední manifestací VZV a naší analýzou je 1216 dní. Ze studie byli vyřazeni pacienti se známou malignitou, imunodeficiencí i autoimunním onemocněním. Kontrolní skupina 40 osob věkově i pohlavím odpovídala skupině pacientů. Všichni z kontrolní skupiny prodělali pouze jednorázovou infekci VZV v dětství v podobě neštovic.

14 pacientů bylo analyzováno během akutní reaktive VZV. Jejich krev byla analyzována 2x. Poprvé ve chvíli objevení se prvních specifických příznaků reaktive a podruhé po ustoupení příznaků (v průměru po uplynutí 9,5 dní, s rozmezím 5-22 dní). Těchto 14 pacientů je zahrnuto v první testované skupině.

Diagnóza VZV byla provedena na základě typických klinických projevů a v indikovaných případech ověřena pomocí PCR.

Periferní krev byla analyzována pomocí průtokové cytometrie (FACSCalibur Becton Dickinson, Mountain View, CA) s použitím CellQuest software.

Pro povrchové znaky:

Buňky (plnou periferní krev) jsme inkubovali 15 minut ve tmě při 4st.C s následujícími monoklonálními protilátkami (fluorochromkonjugované): anti-6B11 (6B11), anti-CD56 (C5.9 and N901/NKH-1), anti-V γ 9 (IMMU 360), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD158a (HP-3E4), anti-CD161 (DX12), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-NKG2A (131411), anti-NKG2D (149810), anti-CD8 (B9.11).

Následně jsme použili NH_4Cl k lýze erytrocytů. Po centrifugaci (1200 – 2000 otáček po dobu 5 minut) odlijeme supernatant. Po přidání PBS (200 – 500 μl) máme vzorek připraven k analýze.

iNKT buňky byly identifikovány jako $6B11^+CD3^+$, NK buňky jako $CD56^+CD3^-$ a T buňky jako $CD56^-CD3^+$

Metoda intracytoplasmatického barvení:

Přes noc necháme in vitro stimulovat plnou krev pomocí PMA a ionomycinu v přítomnosti Brefeldinu A, který stabilizuje membránu. Dojde k nastimulování TCR a k produkci cytokinů. Centrifugací odstraníme supernatant. Suspenzi buněk obarvíme povrchovými protilátkami konjugovanými s fluorochromy. V dalším kroku fixujeme 20 minut při pokojové teplotě 2% paraformaldehydem. Perforace membrány jsme docílili inkubací s PBS obsahující 0,5% saponin a 1% BSA. Následně byly použity intracytoplasmatické protilátky anti-IFN- γ (45.15), anti-TNF- α (IPM2/188), anti-IL-4 (4D9), anti-IL-13 (32007) zředěné v permeabilizačním pufru (saponin) a ponechané ve tmě 30 minut při pokojové teplotě. Na závěr jsme buňky vymyli a použili jsme základní FACS pufr k analýze pomocí FACSCalibur s použitím CellQuest software.

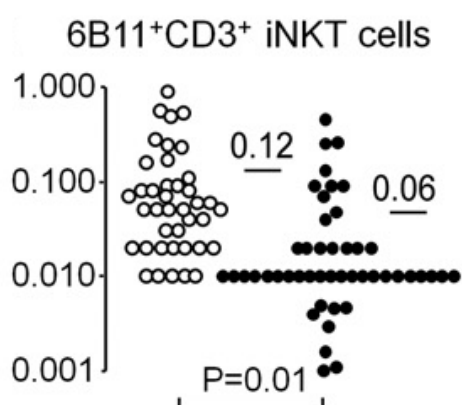
Pro povrchové i intracytoplasmatické znaky byly použity monoklonální protilátky firem: BD Pharmingen, Immunotech, Sigma – Aldrich a RDSystems – BIOMEDICA.

Ke statistické analýze byl použit nepárový Studentův T-test.

Výsledky (VZV):

Srovnání zastoupení jednotlivých populací lymfocytů u VZV pacientů a u kontrol ukázalo signifikantní rozdíl u $6B11^{+}CD3^{+}$ buněk. Konkrétně zastoupení iNKT ($6B11^{+}CD3^{+}$) bylo signifikantně nižší u VZV pacientů, kteří obtížně kontrolují VZV infekce (časté reaktivace viru) než u kontrol.

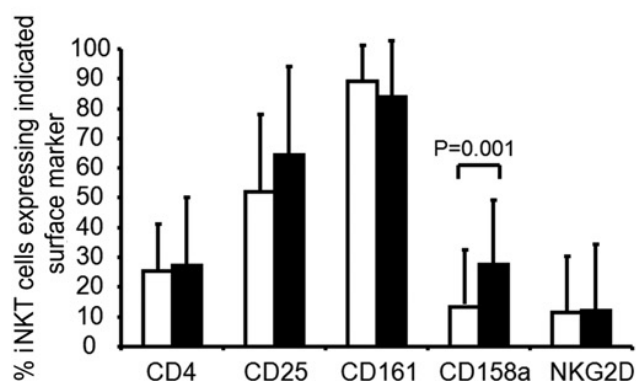
Obrázek 8: *Pacienti VZV černé body, kontroly bílé body.*



Hlavní subpopulace iNKT ($CD4^{+}$ a $CD4-CD8^{-}$) byly u obou skupin rovnoměrně zastoupeny. Stejně tak nebyl signifikantní rozdíl v expresi T či NK buněčných znaků ($CD25$, $CD161$, $NKG2D$) na povrchu iNKT lymfocytů.

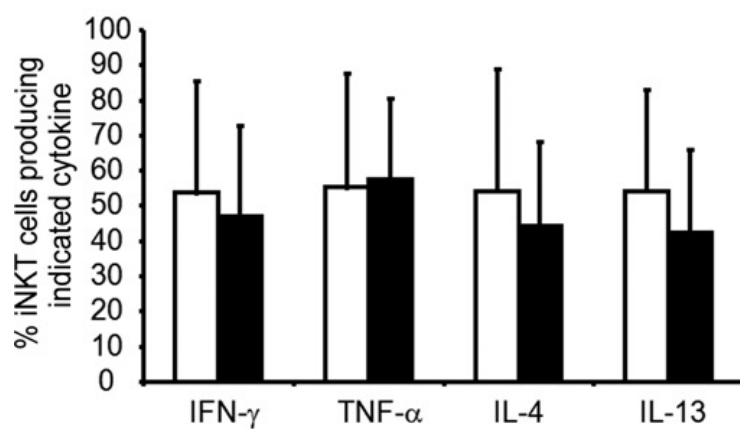
iNKT lymfocyty VZV pacientů však vykazovaly signifikantně zvýšenou expresi inhibičního $CD158a$ receptoru. $CD158a$ receptor patří do rodiny inhibičních KIR receptorů. Tyto $CD158a$ receptory byly navíc dále upregulovány v době akutní virové infekce.

Obrázek 9: VZV pacienti černý sloupec, kontroly – bílý sloupec.



Intracytoplazmatické měření cytokinové produkce Th1 (IFN- γ , TNF- α) a Th2 (IL-4 a IL-13) profilu prokázalo totožné hodnoty u obou skupin.

Obrázek 10: Pacienti černý sloupec vs. kontroly – bílý sloupec.



Následně jsme pozornost zaměřili na analýzu cytokinové produkce iNKT lymfocytů během akutní reaktivace VZV. Získaná data byla srovnávána s daty získanými po odeznění akutní infekce (v průměru po 9,5 dnech).

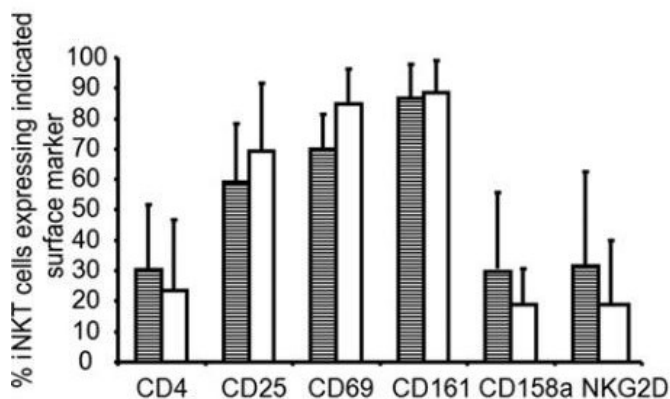
Přesto, že jsme nezaznamenali změny v množství iNKT, v proporcí zastoupení jejich subpopulací ani změnu cytokinové produkce při akutní infekci VZV, došlo k výrazné změně exprese NK znaků na povrchu iNKT lymfocytů.

Konkrétně již zmiňovaný inhibiční CD158a receptor, který byl u VZV pacientů signifikantně zvýšeně exprimován, byl ještě více upregulován při akutní infekci ve srovnání s klidovým stavem VZV pacientů.

Stejně tak došlo při akutní infekci i ke zvýšené expresi NKG2D u některých pacientů. Zde však zvýšení nedosáhlo signifikantních hodnot. Navíc zvýšená exprese NKG2D během akutní exacerbace VZV infekce nebyla omezena jen na iNKT lymfocyty. Stejná zvýšená exprese byla pozorována i na klasických NK buňkách, CD3+CD56+ a V γ 9 T lymfocytech. Statisticky signifikantní však nebyla zvýšená exprese NKG2D ani na jedné buněčné populaci (p = 0,06 pro NK buňky, p = 0,09 pro iNKT, p = 0,1 pro V γ 9 T lymfocyty)

Obrázek 11: *Expese vybraných T a NK povrchových znaků na iNKT lymfocytech.*

Akutní reaktivace VZV – šrafovaný sloupec, klidový stav – bílý sloupec.





Rapid Communication

Innate-like behavior of human invariant natural killer T cells during herpes simplex virus infection

Lucie Novakova^a, Zuzana Nevoralova^b, Jan Novak^{a,*}^a Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic^b Department of Dermatovenerology, Hospital Jihlava, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2012

Accepted 8 June 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

iNKT cells

NKT cells

Herpes simplex virus

NK cells

Natural killer receptors

ABSTRACT

Invariant natural killer T (iNKT) cells, CD1d restricted T cells, are involved in the immune responses against various infection agents. Here we describe their behavior during reactivation of human herpes simplex virus (HSV). iNKT cells exhibit only discrete changes, which however, reached statistically significant level due to the relatively large patient group. Higher percentage of iNKT cells express NKG2D. iNKT cells down-regulate NKG2A in a subset of patients. Finally, iNKT cells enhance their capacity to produce TNF- α . Our data suggests that iNKT cells are involved in the immune response against HSV and contribute mainly to its early, innate phase.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate-like lymphocytes. They are often called unconventional T cells as they differ in many ways from mainstream MHC-restricted T cells. iNKT cells recognize lipid and glykolipid antigens presented by MHC class I-like molecule CD1d, express highly restricted TCR ($V\alpha 14 J\alpha 18$ chain paired with restricted set of β chains) and the markers of both memory/activated T cells and NK cells. iNKT cells produce promptly cytokines of both Th1 and Th2 profile, interact with cells of both innate and adaptive arm of the immune response and harbor cytotoxic potential [1]. The vast functional potential of iNKT cells enables their participation in broad spectrum of immune responses including the defense against infectious agents [6,19]. The experiments of Grubor-Balk et al. showed that iNKT cells are involved in the immune response against herpes simplex virus (HSV). Indeed, iNKT cell lacking animals infected with SC16 strain of HSV type 1 virus exhibit impaired clearance of the virus and more florid acute infection than wild type animals [8]. In this work we examined the behavior of iNKT cells in human HSV infection.

2. Material and methods

2.1. Patients' characteristics

The patients were recruited from the Department of Dermatovenerology of the Hospital Jihlava. Their characteristics are provided by Table 1. In brief, we recruited 36 patients, 8 males, 28 females. Median age was 38.6 years (15–67 years).

We analyzed their blood twice; at first when the first specific symptoms appeared and then again when the infection resolved (11 days in average; 5–25 days).

The majority of patients experienced repeated HSV infection, median time between reactivations was 365 days. All patients signed informed consent approved by local ethical authorities.

2.2. Surface staining

Fresh peripheral blood was analyzed by flow cytometry. Surface staining was performed with the following mAbs: anti-6B11 (6B11), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-CD8 (B9.11), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD69 (FN50), anti-CD161 (DX12), anti-NKG2A (131411), anti-NKG2D (149810). iNKT cells were defined as 6B11⁺CD3⁺.

2.3. Intracytoplasmic staining

Intracytoplasmic staining was performed as described elsewhere [13] using the following conjugated mAbs: anti-IFN- γ (45.15), anti-TNF- α (IPM2/188), anti-IL-4 (4D9), anti-IL-13 (32007).

* Corresponding author at: Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, 100 00, Prague 10, Czech Republic. Tel.: +420 26716 2994; fax: +420 26716 3058.

E-mail address: novakjan@centrum.cz (J. Novak).

Table 1
Patients demographic and clinical data.

Patient	Sex	Age	Age at onset	Frequency	Sited affected	Treatment	Other infections	Other pathology/treatment
1	M	25	22 years	3–4 times/year	Orolabial	A/yes	No	Atopic eczema
2	M	16	10 years	1/many years	Orolabial	No	No	No
3	F	18	Unknown	1/year	Orolabial	No	No	No
4	F	32	Childhood	1/month	Orolabial	A/yes	No	No
5	M	15	Childhood	1/many years	Orolabial	No	No	No
6	F	22	Childhood	1/month	Orolabial	A/yes	No	No
7	F	54	Childhood	2/month	Orolabial	A/yes	No	No
8	M	45	Childhood	2/month	Orolabial	A/yes	No	No
9	F	41	Childhood	2/month	Orolabial	A/yes	No	No
10	F	57	Childhood	1/month	Orolabial	No	No	No
11	F	54	Childhood	1/year	Orolabial	No	No	No
12	F	55	8 years	1/year	Orolabial	No	No	No
13	F	44	43 years	1/month	Orolabial	No	No	No
14	F	45	Childhood	1/month	Orolabial	No	No	No
15	F	41	Childhood	1/year	Orolabial	A/yes	No	No
16	F	20	Childhood	1/year	Orolabial	A/yes	Viral chill	Atopic eczema
17	F	46	Childhood	1/many years	Orolabial	No	No	No
18	M	36	26 years	1/year	Scruft	A/yes	No	Alopecia universalis/Prednisolon 20mg daily
19	F	16	Childhood	1/many years	Orolabial	A/yes	Viral chill	No
20	F	33	13 years	2/year	Orolabial	A/yes	No	No
21	M	16	Childhood	1/month	Orolabial	No	No	No
22	F	52	Childhood	1/many years	Orolabial	No	No	Atopic eczema/Cyklosporine A
23	M	40	Childhood	1/many years	Orolabial	No	No	Psoriasis vulgaris/Cyklosporine A
24	F	66	56 years	1/year	Orolabial	A/yes	No	No
25	M	37	Childhood	1/year	Orolabial	A/yes	No	Atopic eczema/Cyklosporine A and Methotrexate
26	F	22	Childhood	1/year	Orolabial	A/yes	No	Psoriasis vulgaris/Methotrexate
27	F	40	Childhood	once/3–4 years	Orolabial	A/yes	No	Pemphigus vulgaris/Prednisolon 5mg daily and Cyclosporine A
28	F	34	29 years	1/many years	Orolabial	No	No	No
29	F	24	Childhood	1/year	Orolabial	No	No	No
30	F	26	Childhood	1/year	Orolabial	A/yes	No	No
31	F	50	40 years	1/month	Orolabial	No	No	Atopic eczema/topic corticosteroids
32	F	67	25 years	3–4 times/year	Orolabial	A/yes	No	No
33	F	39	Childhood	1/month	Orolabial	A/yes	No	Atopic eczema/topic corticosteroids, Rheumatoid arthritis/Salazopyrine
34	F	55	Childhood	1/month	Orolabial	A/yes	No	Rheumatoid arthritis/Methylprednisolone 2mg/D
35	F	49	Childhood	1/year	Orolabial	No	No	Ulcerative colitis/Prednisolone 2,5mg/D
36	F	58	Childhood	2/year	Orolabial	A/yes	Viral chill	No

Monoclonal antibodies were purchased from BD Pharmingen, Immunotech, Sigma – Aldrich and RDSsystems – BIOMEDICA.

Cells were acquired with a FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) and analyzed using CellQuest software.

2.4. Statistical analysis

The data was analyzed using paired Student's T-test.

3. Results

3.1. Patients

iNKT cells were analyzed in peripheral blood of 36 patients with acute HSV reactivation. Second analysis was performed when the acute infection resolved, 11 days in average (5–25 days). Further demographic and clinical data are provided by Table 1.

3.2. iNKT cells and their subpopulations during HSV infection

During acute HSV infection, neither the percentage of iNKT cells (Fig. 1A) nor their absolute numbers (Fig. 1B) changed. Similarly the proportion (Fig. 1C) and the absolute numbers (Fig. 1D) of the subpopulations of iNKT cells (CD4⁺, double negative = DN, CD8⁺, CD161⁺ and CD161⁻) underwent only negligible changes

during acute HSV reactivation. Thus, neither iNKT cell nor their subpopulations expand during HSV infection.

3.3. Expression of T-cell markers on iNKT cells during HSV infection

Fig. 1E and F shows that iNKT cells do not up-regulate activation markers CD69 or CD25 during acute HSV infection.

3.4. Expression of NK markers on iNKT cells during HSV infection

The analysis of NK markers revealed that higher proportion of iNKT cells expressed NKG2D during acute infection (AI) than in steady state (SS) (73.78% in AI versus 67.80% in SS, $p = 0.002$, Fig. 1E). Higher proportion of iNKT cells expressing NKG2D did not correspond to MFI of NKG2D on iNKT cells (95.54 in AI versus 99.64 in SS, $p = 0.292$, Fig. 1F).

The up-regulation of NKG2D on iNKT cells mimics to what has been observed on classical NK cells during acute HSV infection [17]. We thus speculated that iNKT cells might substitute the function of NK cells in some patients. To test this hypothesis, we divided patients into two groups, “NK high” and “NK low”; according to median NK cell percentage (8.11% among lymphocytes). We then analyzed the expression of surface markers on iNKT cells separately in these two groups. However, the surface marker-expression pattern on iNKT was similar in both groups (data not shown).

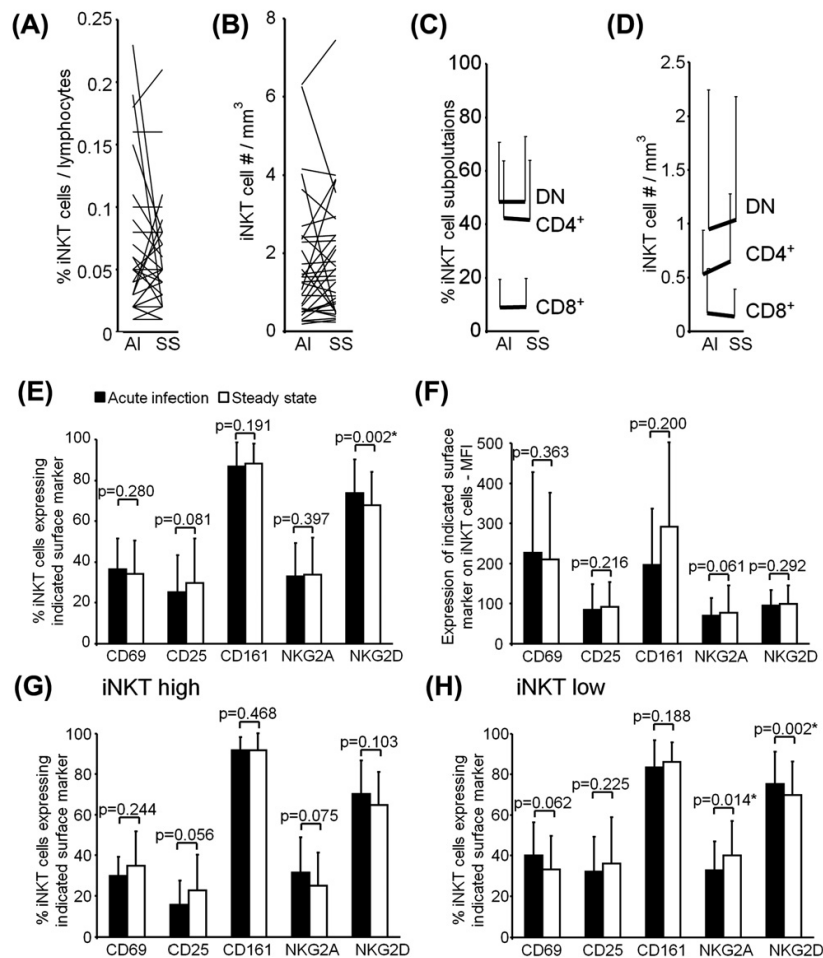


Fig. 1. Amount and phenotype of iNKT cells during acute HSV infection. (A) Frequency of iNKT cells among lymphocytes and (B) absolute number of iNKT cells (cells/mm³) in peripheral blood of patients during acute HSV infection (AI) and steady state (SS). Each line between AI and SS point corresponds to an individual patient (n = 36). (C) Mean percentage of indicated iNKT cell subpopulations among iNKT cells and (D) their mean absolute number (cells/mm³) in peripheral blood of patients during acute infection (AI) and steady state (SS). Each line corresponds to the mean values, error bars indicate the standard deviation. (E,F) Expression of indicated T and NK surface markers on 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells during acute HSV infection (black bars) and in steady state (white bars). The values indicate (E) the mean of cells expressing indicated surface marker and (F) the mean of fluorescence intensity (MFI). Error bars indicate the standard deviation. Patients were divided into two groups according median frequency of iNKT cells: "low iNKT cells patients" (%iNKT cells among lymphocytes in steady state < 0.05%) and "high iNKT cells patients" (%iNKT cells among lymphocytes in steady state > 0.05%). Figures G and H show %iNKT cells expressing indicated surface marker in "high iNKT cells patients" group (G) and in "low iNKT cells patients" (H). Error bars indicate the standard deviation.

Finally, we divided patients according to the median iNKT cell percentage (0.05) into "iNKT low" and "iNKT high" group. Interestingly, iNKT cells behaved in a different way in both groups during HSV reactivation. In "iNKT high" group, the phenotype of iNKT cells did not change (Fig. 1G). In "iNKT low" group, the up-regulation of NKG2D on iNKT cells remained statistically significant (75.18% in AI versus 69.71 in SS, $p = 0.002$, Fig. 1H). Moreover, iNKT cells down-regulated NKG2A in this group of patients during acute HSV infection (32.61% in AI versus 40.03 in SS, $p = 0.014$, Fig. 1H).

3.5. Cytokine production by iNKT cells in acute HSV infection

Intracytoplasmic cytokine content (IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-13) was measured after in vitro restimulation with PMA and ionomycin. During acute infection, more iNKT cells produced TNF- α (87.99% versus 74.19%, $p = 0.0006$, Fig. 2A) but not other cytokine

than in steady state (Fig. 2A). Interestingly, this trend was maintained only in the group of "iNKT cell - high" patient group (89.76% in AI versus 65.43 in SS, $p = 0.0007$, Fig. 2C) but not in "iNKT cell-low" patient group (86.66% in AI versus 80.77 in SS, $p = 0.073$, Fig. 2D).

4. Discussion

In this work we provide indirect data arguing for the involvement of human iNKT cells in the immune response against HSV. Indeed, iNKT cells change the phenotype during HSV reactivation - up-regulate NKG2D, subgroup of patients down-regulate NKG2A and enhance their capacity to produce TNF- α . Importantly, all of these changes were previously shown to mediate clearance of HSV [7].

However, iNKT cells are not probably indispensable for the clearance of HSV. Though the patients with lower percentage of iNKT cells tended to reactivate HSV more frequently, the trend did not reach statistically significant level (correlation coefficient, data not shown).

These findings mirror what has been observed in experimental animal studies. The absence of iNKT cells did not impair the immune response against KOS strain of HSV-1 [5]. The involvement of iNKT cells in anti-HSV immune response was revealed when mice were infected with more aggressive strain of HSV-1 (SC16). The absence of CD1d-restricted T cells in infected animals indeed resulted in impaired clearance of HSV-1 (SC16) and more florid acute infection than wild type animals [8]. These experiments indicate that iNKT cells are not absolutely required for the clearance of common strains of HSV in immunocompetent host. They might play more important role in particular situations such as more aggressive strain of the virus, immunocompromised host etc.

Kastrukoff et al. [11] “quantified” the impact of various cellular population on the clearance of HSV. The absence of iNKT cells increases viral loads 10 times, much less than the absence of NK cells ($1000 \times$), CD4 T cells ($100 \times$) or CD8 T cells ($100 \times$). Importantly, the absence of iNKT cells clinically resembled rather the absence of NK cells than T cells. In both NK-deficient and iNKT-deficient animals the viral loads reached their peak on the day 3, whereas the absence of T cells resulted in the highest viral loads on day 6 [11]. This data indicates that iNKT cells contribute to early, innate, phase of the immune response similar to the effect of NK cells [20].

In this work we provide further support for the hypothesis of innate-like behavior of iNKT cells in HSV infection.

First, we observed the fine tuning of NK receptors on the surface of iNKT cells. iNKT cells up-regulated NKG2D, an activating NK

receptor, that is required for NK cell mediated resistance to many viruses [14]. The up-regulation of NKG2D might be the crucial point of iNKT cell mediated anti-HSV response. HSV, at least in cell lines, down-regulates NKG2D ligand expression. Up-regulation of NKG2D overcomes the loss of its ligand and rescues the potential to kill HSV infected targets [17]. iNKT cells then might lyse HSV-infected targets by perforin upon NKG2D ligand-NKG2D interaction [12].

Patients with low iNKT cell numbers also down-regulated NKG2A. NKG2A is inhibitory receptor that plays a critical role in down-regulating iNKT-cell responses. The blockade of NKG2A receptor rescues the responses of iNKT cells [16]. Given the fact that CD94-NKG2A interaction regulates cytolytic activity of HSV-specific memory CD8 T cells [18], one could speculate, that the down-regulation of NKG2A might represent an additional anti-HSV mechanism of iNKT cells.

Second, iNKT cells enhanced their capacity to produce TNF- α during HSV infection. TNF- α is a potent anti-viral and anti-HSV cytokine [15]. By its secretion iNKT cells might contribute to HSV clearance.

We found difference in the behavior of iNKT cells during HSV infection between two groups of patients—patients with high and low iNKT cell numbers. NK receptor expression profile (both up-regulation of NKG2D and down-regulation of NKG2A) changed only in “iNKT cell low” patient group whereas cytokine production was enhanced only in “iNKT high” group.

Differential behavior of iNKT cells in “iNKT cell high” and “iNKT cell low” patient groups during HSV infection might be caused by various factors. First, the differences might be induced by the virus. Different strain and different virulence of the virus might be responsible for differential behavior of the immune response

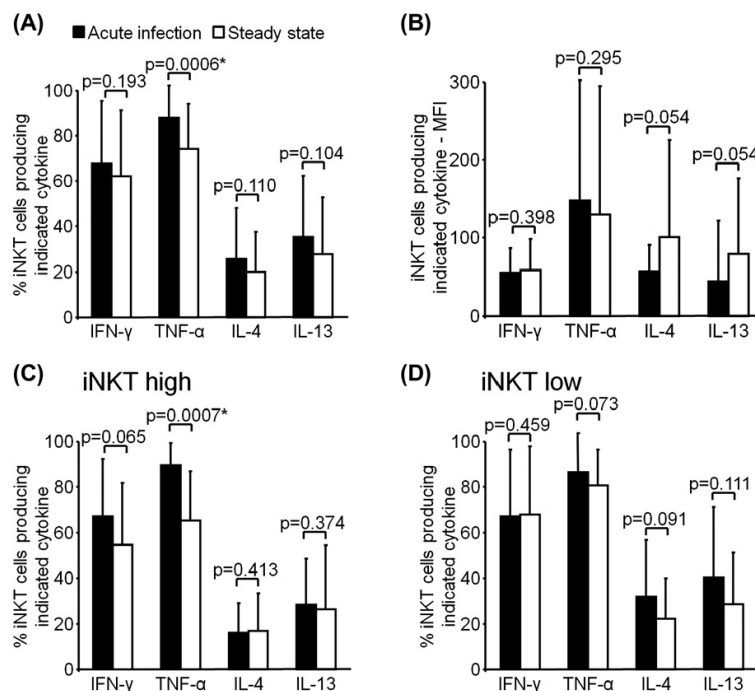


Fig. 2. Production of cytokines by iNKT cells during acute HSV infection. Intracytoplasmic cytokine content in 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells after in vitro re-stimulation during acute HSV reactivation (black bars) and in steady state (white bars). The values indicate (A) the mean of cells producing indicated cytokine and (B) the mean of fluorescence intensity (MFI). Error bars indicate the standard deviation. Intracytoplasmic cytokine content in 6B11⁺CD3⁺ iNKT cells after in vitro re-stimulation in patients with high (C) and (D) low iNKT cell numbers during acute HSV reactivation (black bars) and in steady state (white bars). Values correspond to the mean of cells producing indicated cytokine and error bars indicate the standard deviation.

including iNKT cells. Detailed analysis of the viruses is, however, beyond the scope of this work.

Second, the difference might be given by the intrinsic factors of the hosts. However, the analysis of demographic data did not reveal any difference between both patient groups. There was an identical distribution of the age and sex in both groups of patients. Moreover, there was an identical proportion of patients treated by immunosuppressive drugs in both groups and identical proportion of patients suffering from immune-mediated disorders such as autoimmune or atopic diseases (data not shown). Similarly, the basic characteristics of the immune system (proportion of CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK and B cells) were identical in both groups of the patients (data not shown).

Finally the differences might be induced by iNKT cells themselves. Enhanced capacity to produce TNF- α by iNKT cells from “iNKT high” group is more keeping with expectations that an increase in number of iNKT cells reflects the activation of these cells. However, the restriction of the changes of NK receptor repertoire to the “iNKT low” group seems counterintuitive - changes in iNKT cell phenotype are occurring in the patients in which the numbers of these cells are not increased.

The seeming discrepancy might be explained by factors that regulate NKG2D and NKG2A expression. The expression pattern of NKG2A is in fact more in keeping with expectations. NKG2A expression on iNKT cells is enhanced by TCR ligation and by cytokines such as IL-6, IL-10 or IL-21, whereas IL-4, IL-23 or TGF- β down-regulate the expression [4,16]. Relatively enhanced expression of NKG2A on iNKT cells from “iNKT high” compared to “iNKT low” group might simply reflect the activation status of these cells [16].

A single gene with little polymorphism encodes NKG2D [10]. The expression of NKG2D is regulated by cytokines and ligands of NKG2D. The expression is elevated by IL-2, IL-7, IL-15 and IFN- α whereas IL-21, TGF- β , IFN- γ or chronic exposure of NKG2D to its both soluble and membrane bound ligands down-modulates NKG2D [3].

The potential to produce cytokines on per-cell basis was similar (with the exception of TNF- α) in both patient groups (“iNKT low” and “iNKT high”). However, the total amount of cytokine producing iNKT cells is enhanced (data not shown) and the total amount of cytokines might be increased in patients with high amounts of iNKT cells, a potent cytokine producer. One can speculate that increased amounts of cytokines produced by iNKT cells (IFN- γ) relatively block the up-regulation of NKG2D on iNKT cells in “iNKT high” group as a negative feedback loop.

All above mentioned changes on iNKT cells during HSV infection (expression of NK receptors, enhanced production of TNF- α) were reported as cell percentage. None of these trends was associated with corresponding change of MFI. Probably not a whole iNKT cell pool reacts against HSV. We hypothesize instead that the capacity to express given surface marker or to produce cytokine was induced by HSV in the subpopulation of iNKT cells. Alternatively the particular subpopulation expanded. The hypothetical subpopulation might be found within DN subset that almost exclusively express NKG2 receptors and harbors cytotoxic potential [2,9].

One could argue that our results are influenced by high proportion of patients suffering from autoimmune/inflammatory disorders and treated by immunosuppressive drugs. It must be highlighted that identical results were obtained when these patients were omitted from the analysis (data not shown).

In conclusion our work shows that iNKT cells change phenotype and potential to produce cytokines during HSV reactivation. iNKT cells up-regulate NKG2D, down-regulate NKG2A and enhance capacity to produce TNF- α . These changes can contribute to the

clearance of HSV and are reminiscent of the behavior of NK cells. Altogether our data suggests that iNKT cells are involved in the immune response against HSV and contribute mainly to its early, innate phase [17,20].

Acknowledgment

We are very grateful to Vaclava Kolarikova for her excellent technical help. We thank Agnes Lehuen from INSERM U986, Paris, France for critical reading of the manuscript, to Marie Novakova from Hospital Jihlava for patient's recruitment, to Vojtech Novak for help with Figures. The work was supported by the grant MSM 0021620814. JN is currently supported by research project UNCE204010.

References

- [1] A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton, The Biology of NKT Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 297–336.
- [2] K. Benlagha, A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, A. Bendelac, In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1895–1903.
- [3] S.J. Burgess, K. Maasho, M. Masilamani, S. Narayanan, F. Borrego, J.E. Coligan, The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications, *Immunol. Res.* 40 (2008) 18–34.
- [4] J.H. Cho, H.O. Kim, K. Webster, M. Palendira, B. Hahm, K.S. Kim, C. King, S.G. Tangye, J. Sprent, Calcineurin-dependent negative regulation of CD94/NKG2A expression on naive CD8⁺ T cells, *Blood* 118 (2011) 116–128.
- [5] A.L. Cornish, R. Keating, K. Kyriakoudis, M.J. Smyth, F.R. Carbone, D.I. Godfrey, NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution, *Immunol. Cell Biol.* 84 (2006) 13–19.
- [6] J. Diana, A. Lehuen, NKT cells: friend or foe during viral infections?, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 3283–3291.
- [7] S. Ellermann-Eriksen, Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus, *Virology* 2 (2005) 59.
- [8] B. Grubor-Bauk, A. Simmons, G. Mayrhofer, P.G. Speck, Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR, *J. Immunol.* 170 (2003) 1430–1434.
- [9] J.E. Gumperz, S. Miyake, T. Yamamura, M.B. Brenner, Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 625–636.
- [10] J.P. Houchins, T. Yabe, C. McSherry, F.H. Bach, DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 1017–1020.
- [11] L.F. Kastrukoff, A.S. Lau, F. Takei, M.J. Smyth, C.M. Jones, S.R. Clarke, F.R. Carbone, Redundancy in the immune system restricts the spread of HSV-1 in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 mice, *Virology* 400 (2010) 248–258.
- [12] C. Kuylenstierna, N.K. Bjorkstrom, S.K. Andersson, P. Sahlstrom, L. Bosnjak, D. Paquin-Proulx, K.J. Malmberg, H.G. Ljunggren, M. Moll, J.K. Sandberg, 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 (2011) 1913–1923.
- [13] V. Laloux, L. Beaudoin, C. Ronet, A. Lehuen, Phenotypic and functional differences between NKT cells colonizing splanchic and peripheral lymph nodes, *J. Immunol.* 168 (2002) 3251–3258.
- [14] L.L. Lanier, NKG2D in innate and adaptive immunity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 560 (2005) 51–56.
- [15] P. Lundberg, P.V. Welander, C.K. Edwards III, R.N. van, E. Cantin, Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2, *J. Virol.* 81 (2007) 1451–1460.
- [16] T. Ota, K. Takeda, H. Akiba, Y. Hayakawa, K. Ogasawara, Y. Ikarashi, S. Miyake, H. Wakasugi, T. Yamamura, M. Kronenberg, D.H. Raulet, K. Kinoshita, H. Yagita, M.J. Smyth, K. Okumura, IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2, *Blood* (2005).
- [17] D. Schepis, M. D'Amato, M. Studahl, T. Bergstrom, K. Karre, L. Berg, Herpes simplex virus infection downmodulates NKG2D ligand expression, *Scand. J. Immunol.* 69 (2009) 429–436.
- [18] S. Suvas, A.K. Azkur, B.T. Rouse, Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8⁺ T cells in the latently infected trigeminal ganglia, *J. Immunol.* 176 (2006) 1703–1711.
- [19] E. Tupin, Y. Kinjo, M. Kronenberg, The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 405–417.
- [20] J.D. Wesley, M.S. Tessmer, D. Chaukos, L. Brossay, NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000106.

V druhém projektu jsme se zaměřili na naši hypotézu u HSV-1, který způsobuje typické orofaryngové infekce.

Materiál a metoda (HSV-1):

Skupina měla tentokrát 36 pacientů (8 mužů a 28 žen), věkový medián 38,6 roků (15-67 let). Ze studie byli vyřazeni pacienti se známou malignitou, imunodeficiencí i autoimunním onemocněním. Periferní krev jsme analyzovali dvakrát. Poprvé ve chvíli objevení specifických příznaků - herpetické léze a podruhé po vymizení klinických příznaků (v průměru za 11 dní, 5 – 25 dní)

Diagnóza infekce herpes simplex I. byla provedena na základě typických klinických projevů.

Periferní krev byla analyzována pomocí průtokové cytometrie (FACSCalibur Becton Dickinson, Mountain View, CA) s použitím CellQuest software.

Metodika byla totožná jako v případě s VZV. Konkrétně:

Pro povrchové znaky:

Buňky (plnou periferní krev) jsme inkubovali 15 minut ve tmě při 4st.C s následujícími monoklonálními protilátkami (fluorochromkonjugované): anti-6B11 (6B11), anti-CD56 (C5.9 and N901/NKH-1), anti-V γ 9 (IMMU 360), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD158a (HP-3E4), anti-CD161 (DX12), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-NKG2A (131411), anti-NKG2D (149810), anti-CD8 (B9.11).

Následně jsme použili NH₄Cl k lýze erytrocytů. Po centrifugaci (1200 – 2000 otáček po dobu 5 minut) odlijeme supernatant. Po přidání PBS (200 – 500 μ l) máme vzorek připraven k analýze.

iNKT buňky byly identifikovány jako 6B11⁺CD3⁺, NK buňky jako CD56⁺CD3⁻ a T buňky jako CD56⁻CD3⁺

Metoda intracytoplasmatického barvení:

Přes noc necháme in vitro stimulovat plnou krev pomocí PMA a ionomycinu v přítomnosti Brefeldinu A, který stabilizuje membránu. Dojde k nastimulování TCR a produkci cytokinů. Centrifugací odstraníme supernatant. Suspenzi buněk obarvíme povrchovými protilátkami konjugovanými s fluorochromy. V dalším kroku fixujeme 20 minut při pokojové teplotě 2% paraformaldehydem. Perforace membrány jsme docílili inkubací s PBS obsahující 0,5% saponin a 1% BSA. Následně byly použity intracytoplazmatické protilátky anti-IFN- γ (45.15), anti-TNF- α (IPM2/188), anti-IL-4 (4D9), anti-IL-13 (32007) zředěné v permeabilizačním pufru (saponin) a ponechané ve tmě 30 minut při pokojové teplotě. Na závěr jsme buňky vymyli a použili jsme základní FACS pufr k analýze pomocí FACSCalibur s použitím CellQuest software.

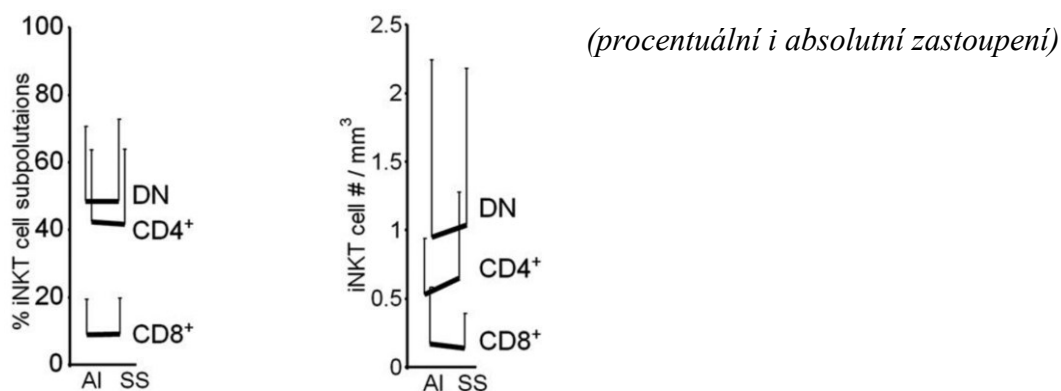
Pro povrchové i intracytoplazmatické znaky byly použity monoklonální protilátky firem: BD Pharmingen, Immunotech, Sigma – Aldrich a RDSystems – BIOMEDICA.

Ke statistické analýze byl použit párový Studentův T-test.

Výsledky (HSV-1):

Během akutní infekce HSV nedošlo k signifikantním změnám v procentuálním ani absolutním zastoupení iNKT lymfocytů.

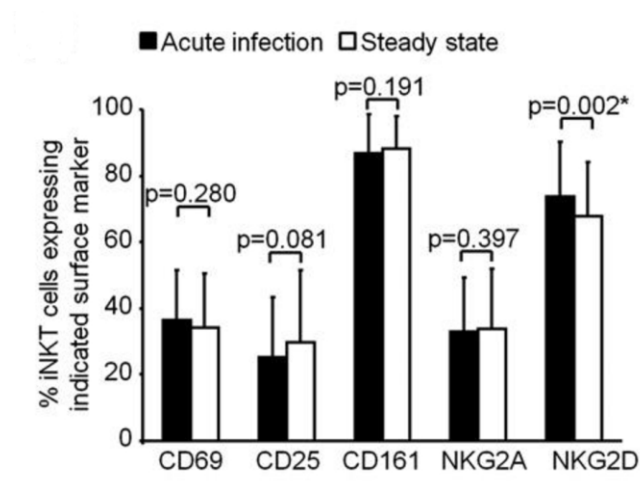
Obrázek 12: Srovnání subpopulace iNKT během akutní infekce HSV-1 a steady state.



Zároveň jsme během akutní HSV infekce neprokázali zvýšenou expresi aktivačních znaků CD69 či CD25.

Zajímavých výsledků jsme získali analýzou NK buněčných znaků na povrchu iNKT lymfocytů. Signifikantně větší množství iNKT lymfocytů exprimuje více NKG2D receptoru během akutní infekce než během klidového stavu.

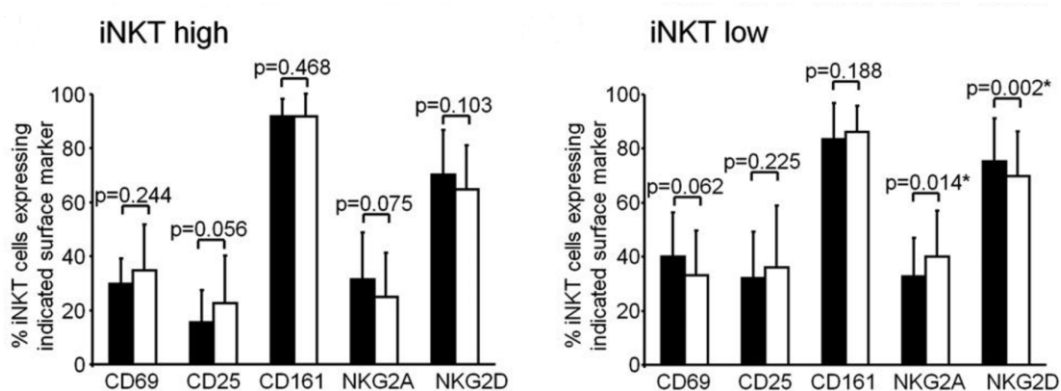
Obrázek 13: Exprese povrchových znaků iNKT lymfocytů během akutní infekce HSV-1 (černý sloupec) a ve steady state (bílý sloupec).



Rozdělili jsme si pacienty do 2 skupin - “iNKT low” a “iNKT high”. Pozoruhodné bylo zjištění, že se iNKT lymfocyty chovají v obou skupinách odlišně během HSV reaktivace. Ve skupině iNKT high nedošlo ke změně fenotypu. Zatímco ve skupině iNKT low zvýšená exprese NKG2D zůstala signifikantně významná. Zároveň v této skupině iNKT lymfocyty downregulovaly NKG2A během akutní HSV infekce.

Během akutní infekce více iNKT lymfocytů produkovalo TNF- α než v klidovém stavu. Toto bylo pozorováno jen u “iNKT high” skupiny pacientů. U ostatních měřených cytokinů (IFN- γ , IL – 4 a IL – 13) nedošlo k signifikantním změnám.

Obrázek 14: Množství iNKT (vyjádřeno v %) exprimující jednotlivé povrchové znaky. Srovnání u iNKT high a iNKT low pacientů během akutní infekce HSV-1 (černý sloupec) a během stady state (bílý sloupec).



ZÁVĚREČNÁ DISKUZE

I. Interferují iNKT buňky s herpetickou infekcí? Hrají roli v kontrole herpetické infekce nebo regulují imunitní systém?

V první části bylo cílem zjistit, zda dochází ke změně iNKT buněk během herpetických infekcí nebo zda zůstávají indiferentní. První jsme se zaměřili na VZV infekci, kde jsme jako pacienty zvolili skupinu osob, kde pacienti prodělávají reinfekce VZV v podobě pásového oparu, zatímco skupinou kontrolní byly osoby, které prodělaly VZV pouze jako primoinfekci neštovic v dětství. V druhém případě jsme chtěli zjistit, zda dochází ke změně fenotypu nebo funkce iNKT buněk během akutní infekce HSV-1 a po jejím odeznění.

Důvodů, proč jsme se zaměřili na herpetické infekce, bylo hned několik. Je již prokázáno, že rod herpesvirů downreguluje expresi CD1d [191]. Jelikož CD1d molekuly prezentují glykolipidové antigeny iNKT lymfocytům, což následně vede k rychlému rozvoji efektorových funkcí iNKT, je velmi pravděpodobné, že touto downmodulací se herpesviry snaží uniknout tomuto mechanismu imunitní odpovědi. CD1d molekula však neprezentuje virové glykolipidy, nemůže tudíž iNKT aktivovat přímo. Je však teoreticky možné, že infekce herpetickým virem vede ke zvýšené expresi a prezentaci endogenního ligandu a ten nepřímo aktivuje iNKT. iNKT ale mohou být stimulovány i jinými mechanismy (cytokiny, svými NK receptory).

Druhým důvodem byly experimentální studie s alfa-herpesviry na myších [224][225]. V těchto experimentálních modelech myši bez iNKT buněk (Ja281^{-/-} a CD1d^{-/-}) měly těžší průběh herpetické infekce (HSV-1 a HSV-2).

Chování iNKT v periferní krvi při herpetických infekcích u lidí dosud systematicky pospáno nebylo. Bylo pro nás velkou výzvou přejít od těchto experimentálních modelů k lidské studii.

Třetím důvodem, proč jsme se rozhodli ověřit hypotézu, zda se kromě NK a T lymfocytů podílejí na kontrole herpetických infekcí i iNKT buňky, je case report 11leté dívky, která rozvinula diseminovanou život ohrožující infekci VZV 5 týdnů po podání živé vakcíny obsahující oslabené viry VZV kmene Oka. Jedinou prokázanou abnormalitou byl těžký deficit iNKT buněk. Tento deficit byl funkční i kvantitativní [198].

Výsledkem první práce je jednoznačná korelace snížených hodnot iNKT lymfocytů s opakovanými reaktivacemi VZV infekce. Naopak porovnání ostatních buněčných populací (T lymfocytů, NK buněk) prokázalo u obou srovnávaných skupin pouze nesignifikantní rozdíly.

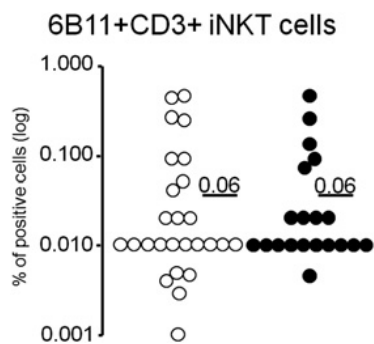
Z výsledků však nelze jednoznačně říci, zda snížení iNKT lymfocytů je příčinou nebo efektem VZV infekce. Virové infekce mohou teoreticky snižovat počet iNKT a to dokonce několika mechanismy.

- iNKT mohou dočasně snížit expresi povrchových znaků po své aktivaci a stanou se nedetekovatelné námi použitými metodami [228]. My jsme k detekci iNKT použili kombinaci protilátky anti-CD3 a monoklonální protilátky proti TCR V α 24J α 18 (název protilátky je 6B11).

- počet iNKT v periferní krvi může být snížen vyčerpáním a to buď absolutně samotným virem nebo relativně relokací iNKT do periferie do místa zánětu.

V těchto případech dočasného vyčerpání, respektive relokace, iNKT bychom však očekávali postupný návrat hodnot iNKT buněk po odeznění akutní herpetické infekce. K tomu však nedošlo a proporční zastoupení iNKT lymfocytů bylo identické při srovnání hodnot u pacientů, kteří měli poslední manifestaci onemocnění před více než 1 rokem s pacienty, kteří prodělali reaktivaci VZV před méně než 1 rokem.

Obrázek 15: Srovnání množství iNKT u pacientů VZV, kteří manifestovali onemocnění před více než 1 rokem (černé body) vs. manifestace VZV před méně než rokem (bílé body).



II. Mění iNKT buňky fenotyp nebo funkci (produkci cytokinů) v době akutní exacerbace herpetické infekce?

Vedle sníženého počtu iNKT u VZV pacientů jsme prokázali i fenotypové a funkční abnormality iNKT v době akutní exacerbace infekce.

V první řadě jsme zaznamenali zvýšenou expresi receptorů NKG2D na povrchu iNKT lymfocytů. To koresponduje se zvýšením těchto receptorů na klasických NK buňkách během herpetických infekcí, jak publikoval ve své práci D. Schepis [229]. Tento aktivační receptor byl zvýšeně exprimován u akutní HSV-1 infekce. Ke zvýšení došlo i v případě VZV, zde však zvýšení nedosáhlo signifikantních hodnot.

NKG2D je aktivační receptor NK buněk, který je důležitý pro NK buňkami zprostředkovanou resistenci k mnohým virovým infekcím [230]. Protivirové účinky iNKT mohou být proto podobně jako u NK buněk spouštěny přímo přes NKG2D receptor. Po navázání ligandu NKG2D na receptor NKG2D dojde k aktivaci iNKT buňky a k následné cytolyze infikované buňky za pomoci perforinů [231]. HSV downreguluje expresi NKG2D ligandu, čímž se snaží vyhnout tomuto mechanismu protivirové obrany [229]. Je velmi pravděpodobné, že námi zjištěná upregulace NKG2D receptoru na povrchu iNKT lymfocytů, “vyrovnává” ztrátu NKG2D ligandu a ponechává cytolytický potenciál iNKT lymfocytům.

Zároveň mohou iNKT lymfocyty přispívat k eliminaci herpetických infekcí nepřímo – podporou ostatních buněčných typů zodpovědných za kontrolu herpetické infekce [232]. Tímto příkladem může být podpora diferenciací virus specifických T a

B lymfocytů s následnou produkcí specifických protilátek. Nabízí se zde i možnost, že iNKT substituují funkci NK buněk u některých pacientů.

iNKT low HSV pacienti zároveň downregulovali NKG2A receptor. NKG2A je inhibiční receptor, který hraje klíčovou roli v potlačení iNKT odpovědi. Blokáda tohoto receptoru vedla k aktivaci funkcí NKT lymfocytů [233]. Jelikož interakce CD94 – NKG2A reguluje cytolytickou aktivitu HSV-specifických paměťových CD8 T lymfocytů [234], může být downregulace NKG2A další mechanismus iNKT buněk proti HSV infekci.

Další zjištěnou změnou fenotypu bylo, že iNKT lymfocyty VZV pacientů exprimují signifikantně více inhibičního receptoru CD158a. Ten je navíc ještě více exprimován při akutně probíhající infekci.

CD158a je receptor patřící do rodiny vysoce polymorfních KIR receptorů (killer-cell immunoglobulin like receptor). Skupina těchto receptorů reguluje cytotoxické funkce NK buněk svou interakcí s MHC I. molekulami na povrchu buněk. Protože CD158a patří do skupiny inhibičních KIR (KIR2DL), tak při rozpoznání vlastních MHC I. molekul inhibuje zabíječskou funkci NK buněk [235].

Kromě NK buněk je CD158a exprimován i T lymfocyty a to $TCR\alpha\beta$ i $TCR\gamma\delta$ [236].

Pacienti s vysokými počty iNKT buněk měli navíc při akutní HSV infekci signifikantně zvýšenou produkci $TNF-\alpha$. $TNF-\alpha$ je potentní antivirový cytokin [237]. Zvýšená sekrece $TNF-\alpha$ iNKT lymfocyty může přispívat k obraně proti HSV. $TNF-\alpha$ je prozánětlivý cytokin, účastní se významným způsobem antivirové obrany [238]. Inhibuje replikaci viru parakrinním účinkem, vazbou na membránu dokáže zvýšit

resistenci dosud nenapadených buněk k virové infekci, štěpením virové RNA dokáže potlačit translaci virových bílkovin a v neposlední řadě navodí lýzu infikovaných buněk zvýšením aktivity cytotoxických T lymfocytů.

Přesný mechanismus, kterým iNKT kontrolují herpetické infekce, teprve čeká na odhalení. Naše výsledky – konkrétně nezměněný profil cytokinové produkce u VZV a zvýšená produkce TNF- α pouze u některých HSV-1 pacientů – mluví však proti klíčové roli námi měřených cytokinů v imunitní reakci iNKT buněk proti herpetickým virům.

Důležitým faktem zůstává, že upregulace NKG2D i downregulace NKG2A byly již dříve popsány jako mechanismy obrany proti HSV [239]. Nám se podařilo tyto změny popsat u iNKT lymfocytů.

Všechny naše výsledky korelují s výsledky experimentálních studií na zvířatech. Účast iNKT na imunitní odpovědi proti HSV byla u myši odhalena, když byly myši experimentálně infikovány více agresivním kmenem HSV-1 (SC16). Myši bez iNKT lymfocytů měly horší průběh HSV-1 (SC16) infekce [224] ve srovnání s kontrolní skupinou. Z těchto experimentů je patrné, že iNKT nejsou absolutně nezbytné pro kontrolu HSV infekce běžnými kmeny u imunokompetentních jedinců, avšak mohou hrát důležitou roli u imunokompromitovaných jedinců, či při nákaze agresivním typem HSV-1. Ačkoliv i naši pacienti s nižší hladinou iNKT lymfocytů reaktivují HSV častěji, nedosáhlo toto zjištění signifikantních hodnot. Usuzujeme tudíž i z našich výsledků, že iNKT nejsou nepostradatelné pro kontrolu HSV infekce.

Závěrem lze říci, že jsme popsali kvantitativní i kvalitativní změny iNKT lymfocytů jak u pacientů s reaktivacemi VZV, tak u akutní HSV-1 infekce. Naše výsledky tudíž naznačují podíl iNKT buněk na kontrole herpetických infekcí.

III. Jakým mechanismem se iNKT podílejí na kontrole alfaherpesvirové infekce?

Z výše uvedeného je zřejmé, že iNKT lymfocyty se podílí na kontrole herpetických infekcí. Zbývá se zamyslet, jakým mechanismem k tomu dochází. Jedná se o mechanismus závislý na produkci cytokinů po stimulaci TCR receptoru nebo se naopak iNKT buňky chovají spíše jako NK buňky a jsou stimulovány nespecifickými signály a reagují změnou exprese inhibičních a aktivačních receptorů?

Z definice a funkce iNKT buněk víme, že iNKT lymfocyty produkují velmi široké spektrum cytokinů, které mnohdy působí “proti sobě”. Mohou se proto chovat jako regulátoři imunitního systému, ale i jako agresoři. Jedna skupina výzkumných prací popisuje iNKT lymfocyty jako prozánětlivé buňky navíc se schopností účastnit se protinádorové imunity [240]–[246], zatímco druhá skupina prací popisuje iNKT lymfocyty jako silné regulátory imunitní odpovědi a popisuje jejich možný vliv v prevenci autoimunitních onemocnění [135], [138], [139].

Pro funkci regulátorů mají velkou řadu předpokladů - jejich potentní schopnost produkovat cytokiny Th2 profilu (především IL-4). Příklady, kdy regulují imunitní odpověď je známo mnoho (roztroušená skleróza [166], [167] SLE [171]–[173], T1DM [137], [160]–[162]).

Na druhou stranu pro možnou funkci agresorů (likvidátorů infekce) svědčí hlavně jejich schopnost produkovat IFN- γ a i jejich chování zde spíše připomíná NK buňky včetně exprese NK povrchových receptorů a cytotoxicity [124], [128].

Naše výsledky ukazují na skutečnost, že se iNKT u herpetických infekcí chovají spíše jako agresoři. Nejvýznamnějším výsledkem svědčící pro tuto teorii je

upregulace NKG2D receptorů, což jsme prokázali u obou prací. Zároveň i zvýšená sekrece TNF- α u některých pacientů svědčí spíše pro prozánětlivou funkci.

Nenašli jsme žádné argumenty, aby u herpetických infekcí byly regulátory imunitní odpovědi. V takovém případě bychom očekávali například zvýšení regulačních cytokinů, ke kterému však ani u jedné práce nedošlo.

IV. Jaká je pozice iNKT buněk v imunitní odpovědi a jaký je jejich evoluční význam?

Jedná se o populaci důležitou pro fungování imunitního systému – je evolučně konzervovaná (stejná) od myši až po člověka, rozeznává identické antigeny u všech savců. Jedná se pravděpodobně o funkci vitální pro každý organismus. Tuto roli/funkci zatím neznáme a dosavadní výzkum ji příliš neobjasnil. Popsal role, které jsou zásadní pro fungování a integritu každého organismu (boj proti infekci, regulace autoimunity), ale i proto, že tyto funkce jdou často proti sobě, je jim těžké porozumět.

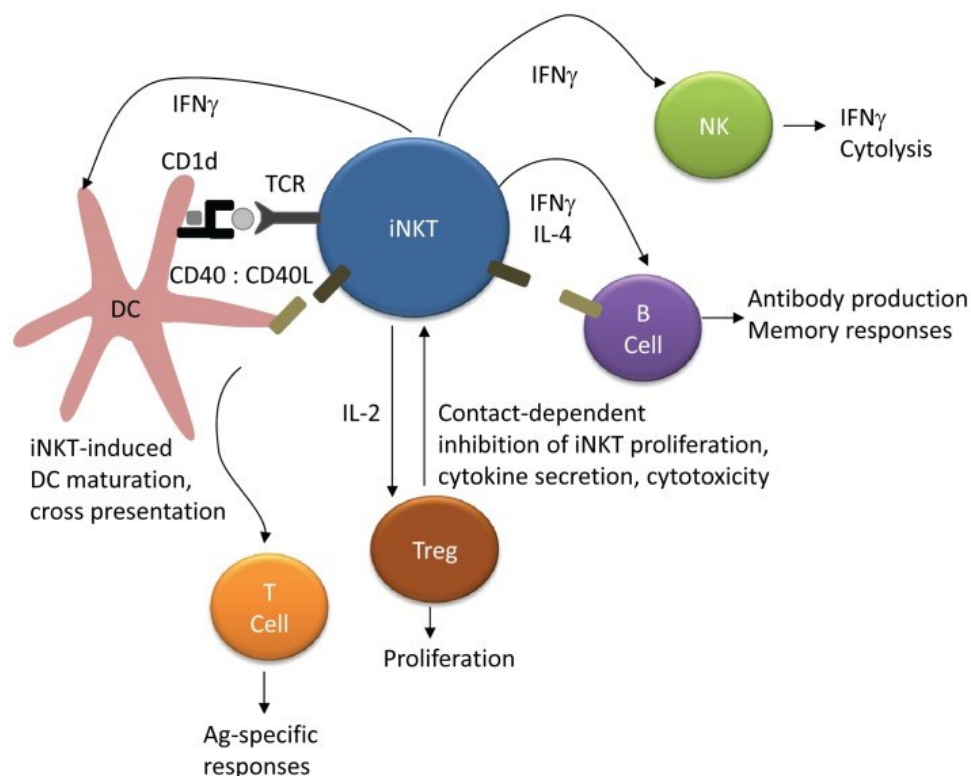
Proč někdy produkují IL-4 a IL-13 a silně regulují imunitní systém, proč v jiných modelech napomáhají sekreci protilátek, proč v některých modelech produkují IFN- γ a likvidují nádorové buňky, proč v některých modelech blokují produkci protilátek a regulují autoimunitní nemoci a konečně proč u virových infekcí mění expresi NK receptorů a kontrolují virovou nálož?

Odpověď zatím neznáme. Je ale možné, že iNKT buňky fungují jako “zesilovač” imunitní reakce. Citlivě monitorují vlastní tkáň a signály od nich přicházející. K tomu jsou dostatečně vybaveny. Mají široké spektrum způsobů aktivace. Aktivace iNKT buněk pomocí CD1d na rozdíl od aktivace konvenčních lymfocytů nevyžaduje prezentaci zralou APC, k aktivaci tudíž dochází velmi záhy, ještě před aktivací konvenčních lymfocytů. iNKT lymfocyty však nejsou závislé pouze na aktivaci zprostředkované TCR, aktivace je možná i prostřednictvím NK receptorů na jejich povrchu či nepřímo kombinací prozánětlivých cytokinů. Dominantní signál pak významně amplifikují a zásadně ovlivní downstream imunitní

odpověď. Buď přímou interakcí s buňkami (NK, B, T) nebo rychlou sekrecí širokého spektra cytokinů záhy po aktivaci. Navozená cytokinová odpověď může být prozánětlivá Th1 (IFN- γ , TNF- α), Th17 či regulační Th2 (IL-4, IL-5, IL-13).

Možnosti interakce s buňkami jsou následující. Aktivace iNKT vede k upregulaci CD40L. Interakce CD40-CD40L a cytokinová sekrece vyvolá aktivaci a maturaci DC, která má za následek antigenní prezentaci a augmentaci odpovědi CD4+ a CD8+ T lymfocytů [129]. Rychlá sekrece IFN- γ navíc velmi záhy aktivuje NK buňky, což vede k další produkci IFN- γ [128]. iNKT lymfocyty mohou také substituovat CD4+ T lymfocyty a pomoci aktivaci B lymfocytů, což vede k produkci protilátek a vzniku B paměťových lymfocytů [247]. Produkce IL-2 aktivovanou iNKT buňkou může navodit proliferaci T regulačních lymfocytů, které následně dokáží inhibovat proliferaci iNKT [248].

Obrázek 16: *Interakce iNKT s ostatními buňkami.* [88]



Pokud by měly iNKT buňky tak centrální roli v imunitním systému, byly by jistě atraktivním cílem terapeutických intervencí. Zda je to reálné, ukáže budoucnost.

Některé pokusy již byly popsány. Limitující pro použití manipulace s iNKT buňkami u lidí je jejich signifikantně nižší zastoupení v periferní krvi ve srovnání s experimentálními modely na myších (10-1000x).

Další alarmující fakt při manipulaci s iNKT buňkami je skutečnost, že experimentální podání α -GalCer u myší může navodit jak akceleraci [249], [250] tak indukci [251] autoimunitního onemocnění.

První klinické studie s podáním α -GalCer byly provedeny na onkologických pacientech [252]–[255]. Žádná studie nevedla k signifikantním výsledkům, ve všech případech došlo k aktivaci vrozené i adaptivní imunity a studie měly jen mírné nežádoucí účinky.

Obecnou snahou proto je vyvinout syntetické antigeny, které mediují pouze silnou IFN- γ nebo pouze silnou IL-4 odpověď.

Tento poznatek by mohl být důležitý pro využití jako adjuvans ve vakcínách či pro stimulaci protinádorové imunity.

Věřím, že moje práce přispěla k tomu, že jsme porozuměli jedné z jejich funkcí a to chování při akutní virové infekci.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Plné znění těchto publikací je součástí práce.

- **Lucie Nováková**, Agnes Lehuen and Jan Novák: Low numbers and altered phenotype of iNKT in recurrent herpes zoster infection
Cellular Immunology, 2011, 269(2):78-81. **IF₂₀₂₀: 4.078**
- **Lucie Nováková**, Zuzana Nevoralová, Jan Novák: Innate-like behavior of human invariant natural killer T cells during herpes simplex virus infection
Cellular Immunology, 2012 Jul-Aug;278(1-2):16-20 **IF₂₀₂₀: 4.078**

OSTATNÍ PUBLIKACE AUTORA:

- Novak J, Dobrovolny J, **Novakova L**, Kozak T The Decrease in Number and Change in Phenotype of Mucosal-Associated Invariant T cells in the Elderly and Differences in Men and Women of Reproductive Age. **Scand J Immunol**, 2014 Oct;80(4):271-5. **IF₂₀₂₀: 3.487**
- Novák, J.; **Nováková, L.:** Prevention and Treatment of Type I Diabetes Mellitus by the Manipulation of Invariant Natural Killer T Cells. **Clin Exp Med**. 2013 Nov;13(4):229-37. **IF₂₀₂₀: 2.644**
- Novák J., Dobrovolny J, Tousek P, Kocka V, Teringova E, **Novakova L**, Widimsky P.: Potential role of invariant natural killer T cells in outcomes of acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**. 2015;187:663-5. **IF₂₀₁₉: 3.290**
- Novak J, Dobrovolny J, Brozova J, **Novakova L**, Kozak T.: Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Clin Exp Med**. 2016 Nov;16(4):529-537. **IF₂₀₂₀: 2.644**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] H. Arase, N. Arase, K. Ogasawara, R. A. Good, and K. Onoé, “An NK1.1+ CD4+8- single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 14, pp. 6506–10, Jul. 1992.
- [2] Z. K. Ballas and W. Rasmussen, “NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset.,” *J. Immunol.*, vol. 145, no. 4, pp. 1039–45, Aug. 1990.
- [3] K. Imai, M. Kanno, H. Kimoto, K. Shigemoto, S. Yamamoto, and M. Taniguchi, “Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor alpha-chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 22, pp. 8708–12, Nov. 1986.
- [4] H. Koseki *et al.*, “Dominant expression of a distinctive V14+ T-cell antigen receptor alpha chain in mice.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 17, pp. 7518–22, Sep. 1991.
- [5] H. Koseki, K. Imai, F. Nakayama, T. Sado, K. Moriwaki, and M. Taniguchi, “Pillars article: homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor α chain expanded in unprimed mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990. 87: 5248-5252.,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 3, pp. 993–7, Aug. 2014.
- [6] H. Arase, N. Arase, K. Nakagawa, R. A. Good, and K. Onoé, “NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 307–10, Jan. 1993.
- [7] A. Bendelac, N. Killeen, D. R. Littman, and R. H. Schwartz, “A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules.,” *Science*, vol. 263, no. 5154, pp. 1774–8, Mar. 1994.
- [8] A. Bendelac, O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and R. R. Brutkiewicz, “CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes.,” *Science*, vol. 268, no. 5212, pp. 863–5, May 1995.
- [9] F. M. Spada, Y. Koezuka, and S. A. Porcelli, “CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells.,” *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 8, pp. 1529–34, Oct. 1998.
- [10] D. I. Godfrey, H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer, “NKT cells: what’s in a name?,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 3, pp. 231–7, Mar. 2004.
- [11] O. Lantz and A. Bendelac, “An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans.,” *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 3, pp. 1097–106, Sep. 1994.
- [12] K. Benlagha, A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac, “In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers.,” *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 11, pp. 1895–903, Jun. 2000.
- [13] J. L. Matsuda *et al.*, “Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers.,” *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 5, pp.

- 741–54, Sep. 2000.
- [14] A. Bendelac, “Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes,” *J. Exp. Med.*, vol. 182, no. 6, pp. 2091–6, Dec. 1995.
- [15] D. G. Pellicci *et al.*, “Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1816–23, Jul. 2003.
- [16] D. I. Godfrey and S. P. Berzins, “Control points in NKT-cell development,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 7, pp. 505–518, 2007.
- [17] H. Watarai *et al.*, “Development and Function of Invariant Natural Killer T Cells Producing TH2- and TH17-Cytokines,” *PLoS Biol.*, vol. 10, no. 2, p. e1001255, Feb. 2012.
- [18] A. K. Savage *et al.*, “The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage,” *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 391–403, 2008.
- [19] D. Kovalovsky *et al.*, “The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1055–1064, 2008.
- [20] L. Gapin, “Development of invariant natural killer T cells,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 39, Elsevier Ltd, pp. 68–74, 01-Apr-2016.
- [21] S. B. Bennis, “Unraveling natural killer T-cells development,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. JAN, Frontiers Media S.A., 09-Jan-2018.
- [22] K. Benlagha, D. G. Wei, J. Veiga, L. Teyton, and A. Bendelac, “Characterization of the early stages of thymic NKT cell development,” *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 4, pp. 485–492, 2005.
- [23] Y. Chung *et al.*, “A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 4, pp. 2276–83, 2008.
- [24] F. W. McNab *et al.*, “The Influence of CD1d in Postselection NKT Cell Maturation and Homeostasis,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 6, pp. 3762–3768, 2005.
- [25] K. Benlagha, T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac, “A thymic precursor to the NKT cell lineage,” *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5564, pp. 2438–41, 2002.
- [26] D. G. Pellicci, K. J. L. Hammond, A. P. Uldrich, A. G. Baxter, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey, “A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage,” *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 7, pp. 835–44, Apr. 2002.
- [27] F. W. McNab *et al.*, “Peripheral NK1.1⁻ NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 10, 2007.
- [28] S. P. Berzins, F. W. McNab, C. M. Jones, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey, “Long-Term Retention of Mature NK1.1+ NKT Cells in the Thymus,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 7, pp. 4059–4065, 2006.
- [29] J. L. Matsuda, T. Mallevaey, J. Scott-Browne, and L. Gapin, “CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system,” *Curr. Opin.*

- Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 358–68, Jun. 2008.
- [30] J. S. Bezradica *et al.*, “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny.” *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 487–97, Sep. 2006.
- [31] L. Gapin, J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg, “NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 10, pp. 971–978, 2001.
- [32] V. Laloux, L. Beaudoin, C. Ronet, and A. Lehuen, “Phenotypic and functional differences between NKT cells colonizing splanchnic and peripheral lymph nodes.” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 7, pp. 3251–8, Apr. 2002.
- [33] P. T. Lee, K. Benlagha, L. Teyton, and A. Bendelac, “Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells.” *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 5, pp. 637–41, Mar. 2002.
- [34] J. E. Gumperz, S. Miyake, T. Yamamura, and M. B. Brenner, “Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining.” *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 5, pp. 625–36, Mar. 2002.
- [35] S. Ishihara *et al.*, “CD8+NKR-P1A+ T cells preferentially accumulate in human liver,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, no. 8, pp. 2406–2413, 1999.
- [36] S. Porcelli, C. E. Yockey, M. B. Brenner, and S. P. Balk, “Pillars article: analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- α/β T cells demonstrates preferential use of several V β genes and an invariant TCR α chain. *J. Exp. Med.* 1993. 178: 1-16.” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 3, pp. 977–92, Aug. 2014.
- [37] A. Bendelac, M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark, “Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function.” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 535–62, Jan. 1997.
- [38] H. J. van Der Vliet *et al.*, “Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth.” *Blood*, vol. 95, no. 7, pp. 2440–2, Apr. 2000.
- [39] H. Kita *et al.*, “Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer.” *Gastroenterology*, vol. 123, no. 4, pp. 1031–43, Oct. 2002.
- [40] M. Brigl, L. Bry, S. C. Kent, J. E. Gumperz, and M. B. Brenner, “Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection.” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1230–7, Dec. 2003.
- [41] A. J. Tyznik, E. Tupin, N. A. Nagarajan, M. J. Her, C. A. Benedict, and M. Kronenberg, “Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals.” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 7, pp. 4452–6, Oct. 2008.
- [42] M. C. Leite-De-Moraes *et al.*, “A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement.” *J. Immunol.*, vol. 163, no. 11, pp. 5871–6, Dec. 1999.
- [43] J.-M. Doisne *et al.*, “Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria.” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 2, pp. 662–6, Jan. 2011.
- [44] A. Terashima *et al.*, “A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17

- receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 12, pp. 2727–33, Nov. 2008.
- [45] C. Paget *et al.*, "Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids.," *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 597–609, Oct. 2007.
- [46] E. Macho-Fernandez and M. Brigl, "The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions," *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 362, Jul. 2015.
- [47] M. Brigl and M. B. Brenner, "CD1: antigen presentation and T cell function.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 817–90, Jan. 2004.
- [48] C. Y. Yu and C. Milstein, "A physical map linking the five CD1 human thymocyte differentiation antigen genes.," *EMBO J.*, vol. 8, no. 12, pp. 3727–32, Dec. 1989.
- [49] F. Calabi, J. M. Jarvis, L. Martin, and C. Milstein, "Two classes of CD1 genes.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 19, no. 2, pp. 285–92, Feb. 1989.
- [50] S. A. Porcelli and R. L. Modlin, "The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 17, pp. 297–329, Jan. 1999.
- [51] D. C. Barral and M. B. Brenner, "CD1 antigen presentation: how it works," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 12, pp. 929–941, Dec. 2007.
- [52] P. W. Canchis, A. K. Bhan, S. B. Landau, L. Yang, S. P. Balk, and R. S. Blumberg, "Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d.," *Immunology*, vol. 80, no. 4, pp. 561–5, Dec. 1993.
- [53] S. D. Gadola *et al.*, "Structure and binding kinetics of three different human CD1d- α -galactosylceramide-specific T cell receptors," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 3, pp. 699–710, Mar. 2006.
- [54] A. Bendelac, L. Teyton, and P. B. Savage, "Lipid presentation by CD1: the short and the long lipid story.," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 5, pp. 421–2, May 2002.
- [55] N. N. van der Wel *et al.*, "CD1 and major histocompatibility complex II molecules follow a different course during dendritic cell maturation.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. 8, pp. 3378–88, Aug. 2003.
- [56] M. Exley, J. Garcia, S. P. Balk, and S. Porcelli, "Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 1, pp. 109–20, Jul. 1997.
- [57] D. I. Godfrey, D. G. Pellicci, and M. J. Smyth, "Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over?," *Science*, vol. 306, no. 5702, pp. 1687–9, Dec. 2004.
- [58] D. Zhou *et al.*, "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells.," *Science*, vol. 306, no. 5702, pp. 1786–9, Dec. 2004.
- [59] Y. Kinjo *et al.*, "Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells.," *Nature*, vol. 434, no. 7032, pp. 520–5, Mar. 2005.
- [60] J. Mattner *et al.*, "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate

- NKT cells during microbial infections.,” *Nature*, vol. 434, no. 7032, pp. 525–9, Mar. 2005.
- [61] P. J. Brennan *et al.*, “Activation of iNKT cells by a distinct constituent of the endogenous glucosylceramide fraction.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 37, pp. 13433–8, Sep. 2014.
- [62] T. Natori, K. Akimoto, K. Motoki, Y. Koezuka, and T. Higa, “Development of KRN7000, derived from agelasphin produced by Okinawan sponge,” *Folia Pharmacol. Jpn.*, vol. 110, no. SUPPL. 1, 1997.
- [63] T. Kawano *et al.*, “CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.,” *Science*, vol. 278, no. 5343, pp. 1626–9, Nov. 1997.
- [64] P. Rampuria and M. L. Lang, “Regulation of Humoral Immunity by CD1d-Restricted Natural Killer T Cells,” in *Immunology: Immunotoxicology, Immunopathology, and Immunotherapy*, vol. 1, Elsevier, 2018, pp. 55–73.
- [65] T. Uchida *et al.*, “Phase I study of α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 57, no. 3, pp. 337–345, Mar. 2008.
- [66] A. Ishikawa *et al.*, “A Phase I Study of α -Galactosylceramide (KRN7000)-Pulsed Dendritic Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1910–1917, Mar. 2005.
- [67] M. Nieda *et al.*, “Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity.,” *Blood*, vol. 103, no. 2, pp. 383–9, Jan. 2004.
- [68] D. H. Chang *et al.*, “Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of α -galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients,” *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 9, pp. 1503–1517, May 2005.
- [69] V. Sriram, W. Du, J. Gervay-Hague, and R. R. Brutkiewicz, “Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1692–1701, Jun. 2005.
- [70] F. M. Goñi and A. Alonso, “Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1758, no. 12, pp. 1902–1921, Dec. 2006.
- [71] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, and A. Prinetti, “Gangliosides as components of lipid membrane domains,” *Glycobiology*, vol. 17, no. 1, pp. 1R-13R, Jan. 2007.
- [72] D. M. Zajonc, P. B. Savage, A. Bendelac, I. A. Wilson, and L. Teyton, “Crystal structures of mouse CD1d-iGb3 complex and its cognate Valpha14 T cell receptor suggest a model for dual recognition of foreign and self glycolipids.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 377, no. 4, pp. 1104–16, Apr. 2008.
- [73] S. Porubsky, A. O. Speak, B. Luckow, V. Cerundolo, F. M. Platt, and H.-J. Gröne, “Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 14, pp. 5977–82, Apr. 2007.

- [74] A. O. Speak *et al.*, “Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 14, pp. 5971–5976, Apr. 2007.
- [75] P. J. Brennan *et al.*, “Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals.,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1202–11, Oct. 2011.
- [76] M. Inafuku *et al.*, “Beta-Glucosylceramide Administration (i.p.) Activates Natural Killer T cells In Vivo and Prevents Tumor Metastasis in Mice,” *Lipids*, vol. 47, no. 6, pp. 581–591, Jun. 2012.
- [77] P. J. Brennan *et al.*, “Activation of iNKT cells by a distinct constituent of the endogenous glucosylceramide fraction,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 37, pp. 13433–13438, Sep. 2014.
- [78] L. Kain *et al.*, “The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α -linked glycosylceramides.,” *Immunity*, vol. 41, no. 4, pp. 543–54, Oct. 2014.
- [79] S. Lahiri and A. H. Futerman, “The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids.,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, no. 17, pp. 2270–84, Sep. 2007.
- [80] Y. A. Hannun and L. M. Obeid, “Many Ceramides,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 32, pp. 27855–27862, Aug. 2011.
- [81] Y. Ilan, “Alpha versus beta: are we on the way to resolve the mystery as to which is the endogenous ligand for natural killer T cells?,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 158, no. 3, pp. 300–7, Dec. 2009.
- [82] K. Miyamoto, S. Miyake, and T. Yamamura, “A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells.,” *Nature*, vol. 413, no. 6855, pp. 531–4, Oct. 2001.
- [83] J. Schmieg, G. Yang, R. W. Franck, and M. Tsuji, “Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide.,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 11, pp. 1631–41, Dec. 2003.
- [84] K. O. A. Yu *et al.*, “Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 9, pp. 3383–8, Mar. 2005.
- [85] S. Sidobre and M. Kronenberg, “CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells.,” *J. Immunol. Methods*, vol. 268, no. 1, pp. 107–21, Oct. 2002.
- [86] M. Trappeniers *et al.*, “Synthesis and in vitro evaluation of alpha-GalCer epimers.,” *ChemMedChem*, vol. 3, no. 7, pp. 1061–70, Jul. 2008.
- [87] E. Girardi and D. M. Zajonc, “Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells.,” *Immunol. Rev.*, vol. 250, no. 1, pp. 167–79, Nov. 2012.
- [88] J. A. Juno, Y. Keynan, and K. R. Fowke, “Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 8, p. e1002838, Aug. 2012.
- [89] B. K. Chung *et al.*, “Innate immune control of EBV-infected B cells by

- invariant natural killer T cells.,” *Blood*, vol. 122, no. 15, pp. 2600–8, Oct. 2013.
- [90] D. J. Sanchez, J. E. Gumperz, and D. Ganem, “Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1369–78, May 2005.
- [91] W. Yuan, A. Dasgupta, and P. Cresswell, “Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling.,” *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 8, pp. 835–42, Aug. 2006.
- [92] P. P. Chang *et al.*, “Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses,” *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2012.
- [93] L. Lynch *et al.*, “Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T reg cells and macrophages in adipose tissue,” *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 85–95, Dec. 2015.
- [94] D. Sag, P. Krause, C. C. Hedrick, M. Kronenberg, and G. Wingender, “IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 9, pp. 3725–3740, Sep. 2014.
- [95] D. Krijgsman, M. Hokland, and P. J. K. Kuppen, “The role of natural killer T cells in cancer-A phenotypical and functional approach,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. FEB. Frontiers Media S.A., p. 367, 27-Feb-2018.
- [96] S. Cardell, S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis, “CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice.,” *J. Exp. Med.*, vol. 182, no. 4, pp. 993–1004, Oct. 1995.
- [97] Y. H. Chiu *et al.*, “Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments.,” *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 1, pp. 103–10, Jan. 1999.
- [98] S. Dasgupta and V. Kumar, “Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset,” *Immunogenetics*, vol. 68, no. 8, pp. 665–676, Aug. 2016.
- [99] E. Macho-Fernandez and M. Brigl, “The Extended Family of CD1d-Restricted NKT Cells: Sifting through a Mixed Bag of TCRs, Antigens, and Functions.,” *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JUL, p. 362, 2015.
- [100] Y. Nishioka, S. Masuda, U. Tomaru, and A. Ishizu, “CD1d-restricted type II NKT cells reactive with endogenous hydrophobic peptides,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. MAR. Frontiers Media S.A., 15-Mar-2018.
- [101] A. Gonzalez, I. Andre-Schmutz, C. Carnaud, D. Mathis, and C. Benoist, “Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5⁺T cells in autoimmune diabetes,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 12, pp. 1117–1125, 2001.
- [102] N. Duarte *et al.*, “Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells.,” *J. Immunol.*, vol. 173, no. 5, pp. 3112–8, Sep. 2004.
- [103] S. M. Behar, T. A. Podrebarac, C. J. Roy, C. R. Wang, and M. B. Brenner, “Diverse TCRs recognize murine CD1.,” *J. Immunol.*, vol. 162, no. 1, pp. 161–7, Jan. 1999.

- [104] E. Martin *et al.*, “Stepwise development of MAIT cells in mouse and human.,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 3, p. e54, Mar. 2009.
- [105] E. Tupin, Y. Kinjo, and M. Kronenberg, “The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 6, pp. 405–17, Jun. 2007.
- [106] M. Brigl *et al.*, “Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection.,” *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 6, pp. 1163–77, Jun. 2011.
- [107] K. L. Holzapfel, A. J. Tyznik, M. Kronenberg, and K. A. Hogquist, “Antigen-dependent versus -independent activation of invariant NKT cells during infection.,” *J. Immunol.*, vol. 192, no. 12, pp. 5490–8, Jun. 2014.
- [108] P. W. Canchis, A. K. Bhan, S. B. Landau, L. Yang, S. P. Balk, and R. S. Blumberg, “Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d.,” *Immunology*, vol. 80, no. 4, pp. 561–5, Dec. 1993.
- [109] R. S. Blumberg *et al.*, “Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells.,” *J. Immunol.*, vol. 147, no. 8, 1991.
- [110] H. Arase, N. Arase, and T. Saito, “Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking.,” *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 5, pp. 2391–6, May 1996.
- [111] M. Exley, S. Porcelli, M. Furman, J. Garcia, and S. Balk, “CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains.,” *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 5, pp. 867–76, Sep. 1998.
- [112] S. Y. Thomas *et al.*, “CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells.,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 5, pp. 2571–80, Sep. 2003.
- [113] E. J. Kunkel and E. C. Butcher, “Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes.,” *Immunity*, vol. 16, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2002.
- [114] C. H. Kim, B. Johnston, and E. C. Butcher, “Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity.,” *Blood*, vol. 100, no. 1, pp. 11–6, Jul. 2002.
- [115] J. L. Matsuda *et al.*, “Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using Cd1d Tetramers,” *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 5, pp. 741–754, 2000.
- [116] D. B. Stetson *et al.*, “Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 7, pp. 1069–1076, 2003.
- [117] J. L. Matsuda *et al.*, “Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 14, pp. 8395–400, 2003.
- [118] L. H. Glimcher, M. J. Townsend, B. M. Sullivan, and G. M. Lord, “Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells,”

- Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 11. pp. 900–911, 2004.
- [119] A. O’Garra, “Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.,” *Immunity*, vol. 8, no. 3, pp. 275–83, Mar. 1998.
- [120] A. Bendelac, R. D. Hunziker, and O. Lantz, “Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells.,” *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 4, pp. 1285–93, Oct. 1996.
- [121] A. Lehuen *et al.*, “Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes.,” *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 10, pp. 1831–9, Nov. 1998.
- [122] G. Eberl and H. R. MacDonald, “Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 4, pp. 985–92, Apr. 2000.
- [123] C. Carnaud *et al.*, “Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.,” *J. Immunol.*, vol. 163, no. 9, pp. 4647–50, Nov. 1999.
- [124] G. Eberl, P. Brawand, and H. R. MacDonald, “Selective bystander proliferation of memory CD4+ and CD8+ T cells upon NK T or T cell activation.,” *J. Immunol.*, vol. 165, no. 8, pp. 4305–11, Oct. 2000.
- [125] J. Stein-Streilein, “Invariant NKT cells as initiators, licensors, and facilitators of the adaptive immune response.,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 12, pp. 1779–83, Dec. 2003.
- [126] O. O. Yang *et al.*, “CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation.,” *J. Immunol.*, vol. 165, no. 7, pp. 3756–62, Oct. 2000.
- [127] S. Caielli *et al.*, “On/off TLR signaling decides proinflammatory or tolerogenic dendritic cell maturation upon CD1d-mediated interaction with invariant NKT cells.,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 12, pp. 7317–29, Dec. 2010.
- [128] C. Carnaud *et al.*, “Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.,” *J. Immunol.*, vol. 163, no. 9, pp. 4647–50, Nov. 1999.
- [129] I. F. Hermans *et al.*, “NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells.,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 5140–7, Nov. 2003.
- [130] J. Cui *et al.*, “Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors.,” *Science*, vol. 278, no. 5343, pp. 1623–6, Nov. 1997.
- [131] M. J. Smyth, N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita, and D. I. Godfrey, “NKT cells - conductors of tumor immunity?,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, no. 2, pp. 165–71, Apr. 2002.
- [132] M. Terabe *et al.*, “NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway.,” *Nat. Immunol.*, vol. 1, no. 6, pp. 515–20, Dec. 2000.
- [133] M. Terabe *et al.*, “Transforming Growth Factor- β Production and Myeloid Cells Are an Effector Mechanism through Which CD1d-restricted T Cells Block Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Tumor Immunosurveillance:

- Abrogation Prevents Tumor Recurrence,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 11, pp. 1741–1752, Dec. 2003.
- [134] G. Giaccone *et al.*, “A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 12, pp. 3702–9, Dec. 2002.
- [135] M. A. Berman *et al.*, “Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus,” *J. Immunol.*, vol. 157, no. 10, pp. 4690–6, Nov. 1996.
- [136] M. G. von Herrath and M. B. Oldstone, “Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus,” *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 3, pp. 531–9, Feb. 1997.
- [137] J. Novak, T. Griseri, L. Beaudoin, and A. Lehuen, “Regulation of type 1 diabetes by NKT cells,” *Int. Rev. Immunol.*, vol. 26, no. 1–2, pp. 49–72, Jan. .
- [138] A. G. Baxter, S. J. Kinder, K. J. Hammond, R. Scollay, and D. I. Godfrey, “Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice,” *Diabetes*, vol. 46, no. 4, pp. 572–82, Apr. 1997.
- [139] J. M. Gombert, A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud, and J. F. Bach, “Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, no. 12, pp. 2989–98, Dec. 1996.
- [140] S. B. Wilson *et al.*, “Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes,” *Nature*, vol. 391, no. 6663, pp. 177–81, Jan. 1998.
- [141] A. Kukreja *et al.*, “Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes,” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 1, pp. 131–40, Jan. 2002.
- [142] J. Kis *et al.*, “Reduced CD4+ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 3, pp. 654–62, Mar. 2007.
- [143] P. T. Lee, A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P. A. Gottlieb, and A. Bendelac, “Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 6, pp. 793–800, Sep. 2002.
- [144] J. Michalek *et al.*, “Immune regulatory T cells in siblings of children suffering from type 1 diabetes mellitus,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 64, no. 5, pp. 531–5, Nov. 2006.
- [145] Y. Oikawa *et al.*, “High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 25, no. 10, pp. 1818–23, Oct. 2002.
- [146] Y. Tsutsumi *et al.*, “Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes,” *Diabet. Med.*, vol. 23, no. 10, pp. 1145–50, Oct. 2006.
- [147] S. P. Berzins *et al.*, “Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 82, no. 3, pp. 247–52, Jun. 2004.
- [148] S. C. Kent *et al.*, “Loss of IL-4 secretion from human type 1a diabetic pancreatic draining lymph node NKT cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4458–64, Oct. 2005.

- [149] F. D. Shi *et al.*, “Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 12, pp. 6777–82, Jun. 2001.
- [150] B. Wang, Y. B. Geng, and C. R. Wang, “CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 3, pp. 313–20, Aug. 2001.
- [151] S. Hong *et al.*, “The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 1052–6, Sep. 2001.
- [152] S. Sharif *et al.*, “Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 1057–62, Sep. 2001.
- [153] L. Beaudoin, V. Laloux, J. Novak, B. Lucas, and A. Lehuen, “NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells,” *Immunity*, vol. 17, no. 6, pp. 725–36, Dec. 2002.
- [154] J. Novak, L. Beaudoin, T. Griseri, and A. Lehuen, “Inhibition of T cell differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 4, pp. 1954–61, Feb. 2005.
- [155] Q.-S. Mi, D. Ly, P. Zucker, M. McGarry, and T. L. Delovitch, “Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells,” *Diabetes*, vol. 53, no. 5, pp. 1303–10, May 2004.
- [156] Y.-G. Chen *et al.*, “Activated NKT cells inhibit autoimmune diabetes through tolerogenic recruitment of dendritic cells to pancreatic lymph nodes,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 3, pp. 1196–204, Feb. 2005.
- [157] Y. N. Naumov *et al.*, “Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 24, pp. 13838–43, Nov. 2001.
- [158] D. Ly, Q.-S. Mi, S. Hussain, and T. L. Delovitch, “Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4+CD25+ regulatory T cells,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 6, pp. 3695–704, Sep. 2006.
- [159] T. Griseri *et al.*, “Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2091–101, Aug. 2005.
- [160] K. J. L. Hammond and M. Kronenberg, “Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity?,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 15, no. 6, pp. 683–9, Dec. 2003.
- [161] L. T. Mars, J. Novak, R. S. Liblau, and A. Lehuen, “Therapeutic manipulation of iNKT cells in autoimmunity: modes of action and potential risks,” *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 9, pp. 471–6, Sep. 2004.
- [162] S. Sharif, G. A. Arreaza, P. Zucker, Q.-S. Mi, and T. L. Delovitch, “Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells,” *J. Mol. Med. (Berl.)*, vol. 80, no. 5, pp. 290–300, May 2002.
- [163] Y. Osman *et al.*, “Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide,” *Eur. J. Immunol.*, vol.

- 30, no. 7, pp. 1919–28, Jul. 2000.
- [164] E. Pál, T. Tabira, T. Kawano, M. Taniguchi, S. Miyake, and T. Yamamura, “Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 1, pp. 662–8, Jan. 2001.
- [165] M. Mizuno *et al.*, “Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice,” *J. Autoimmun.*, vol. 23, no. 4, pp. 293–300, Dec. 2004.
- [166] T. Yoshimoto, A. Bendelac, J. Hu-Li, and W. E. Paul, “Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 25, pp. 11931–4, Dec. 1995.
- [167] M. A. Mieza *et al.*, “Selective reduction of V alpha 14+ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice,” *J. Immunol.*, vol. 156, no. 10, pp. 4035–40, May 1996.
- [168] A. K. Singh *et al.*, “Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 12, pp. 1801–11, Dec. 2001.
- [169] L. T. Mars *et al.*, “Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 12, pp. 6007–11, Jun. 2002.
- [170] A. W. Jahng *et al.*, “Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 12, pp. 1789–99, Dec. 2001.
- [171] B. L. Kotzin, “Systemic lupus erythematosus,” *Cell*, vol. 85, no. 3, pp. 303–6, May 1996.
- [172] D. Zeng *et al.*, “Subsets of transgenic T cells that recognize CD1 induce or prevent murine lupus: role of cytokines,” *J. Exp. Med.*, vol. 187, no. 4, pp. 525–36, Feb. 1998.
- [173] J.-Q. Yang, V. Saxena, H. Xu, L. Van Kaer, C.-R. Wang, and R. R. Singh, “Repeated alpha-galactosylceramide administration results in expansion of NK T cells and alleviates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 8, pp. 4439–46, Oct. 2003.
- [174] D. Zeng, Y. Liu, S. Sidobre, M. Kronenberg, and S. Strober, “Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus,” *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 8, pp. 1211–22, Oct. 2003.
- [175] S. H. Park and A. Bendelac, “CD1-restricted T-cell responses and microbial infection,” *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 788–92, Aug. 2000.
- [176] C. A. Biron and L. Brossay, “NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 458–64, Aug. 2001.
- [177] M. Brigl and M. B. Brenner, “How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens,” *Semin. Immunol.*, vol. 22, no. 2, pp. 79–86, Apr. 2010.
- [178] J. Diana *et al.*, “NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner,” *Immunity*, vol. 30, no. 2, pp. 289–99, Feb. 2009.

- [179] D. Wu *et al.*, “Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 5, pp. 1351–6, Feb. 2005.
- [180] I. Apostolou *et al.*, “Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 9, pp. 5141–6, Apr. 1999.
- [181] M. Mempel *et al.*, “Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 157, no. 2, pp. 509–23, Aug. 2000.
- [182] I. Sugawara, H. Yamada, S. Mizuno, C. Y. Li, T. Nakayama, and M. Taniguchi, “Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice.,” *Tuberculosis (Edinb.)*, vol. 82, no. 2–3, pp. 97–104, Jan. 2002.
- [183] E. Tupin, Y. Kinjo, and M. Kronenberg, “The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 6, pp. 405–17, Jun. 2007.
- [184] Y. Kinjo *et al.*, “Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria.,” *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 9, pp. 978–86, Sep. 2006.
- [185] Y. Kinjo *et al.*, “Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria.,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 10, pp. 966–74, Sep. 2011.
- [186] L. Schofield *et al.*, “CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells.,” *Science*, vol. 283, no. 5399, pp. 225–9, Jan. 1999.
- [187] S. L. H. Van Dommelen and M. A. Degli-Esposti, “NKT cells and viral immunity,” *Immunology and Cell Biology*, vol. 82, no. 3. *Immunol Cell Biol*, pp. 332–341, Jun-2004.
- [188] M. J. Raftery, F. Winau, T. Giese, S. H. E. Kaufmann, U. E. Schaible, and G. Schönrich, “Viral danger signals control CD1d de novo synthesis and NKT cell activation,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 3, pp. 668–679, Mar. 2008.
- [189] D. J. Sanchez, J. E. Gumperz, and D. Ganem, “Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1369–1378, May 2005.
- [190] J. Liu, D. Shaji, S. Cho, W. Du, J. Gervay-Hague, and R. R. Brutkiewicz, “A Threonine-Based Targeting Signal in the Human CD1d Cytoplasmic Tail Controls Its Functional Expression,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 9, pp. 4973–4981, May 2010.
- [191] J. Diana and A. Lehuen, “NKT cells: friend or foe during viral infections?,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 12, pp. 3283–91, Dec. 2009.
- [192] S. L. H. Van Dommelen and M. A. Degli-Esposti, “NKT cells and viral immunity.,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 82, no. 3, pp. 332–41, Jun. 2004.
- [193] D. J. Sanchez, J. E. Gumperz, and D. Ganem, “Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1369–78, May 2005.

- [194] W. Yuan, A. Dasgupta, and P. Cresswell, "Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling," *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 8, pp. 835–42, Aug. 2006.
- [195] K. E. Nichols *et al.*, "Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP.," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 3, pp. 340–5, Mar. 2005.
- [196] H. Bassiri, W. C. Janice Yeo, J. Rothman, G. A. Koretzky, and K. E. Nichols, "X-linked lymphoproliferative disease (XLP): a model of impaired anti-viral, anti-tumor and humoral immune responses.," *Immunol. Res.*, vol. 42, no. 1–3, pp. 145–59, Jan. 2008.
- [197] M. Locci *et al.*, "The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 4, pp. 735–42, Apr. 2009.
- [198] O. Levy *et al.*, "Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells.," *J. Infect. Dis.*, vol. 188, no. 7, pp. 948–53, Oct. 2003.
- [199] H. J. J. van der Vliet *et al.*, "Selective Decrease in Circulating V α 24 + V β 11 + NKT Cells During HIV Type 1 Infection.," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 3, pp. 1490–1495, Feb. 2002.
- [200] A. Motsinger, D. W. Haas, A. K. Stanic, L. Van Kaer, S. Joyce, and D. Unutmaz, "CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection.," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 7, pp. 869–79, Apr. 2002.
- [201] E. Durante-Mangoni *et al.*, "Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells.," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 3, pp. 2159–66, Aug. 2004.
- [202] H. J. J. van der Vliet *et al.*, "Circulating V α 24+V β 11+ NKT cell numbers and dendritic cell CD1d expression in hepatitis C virus infected patients.," *Clin. Immunol.*, vol. 114, no. 2, pp. 183–9, Feb. 2005.
- [203] A. N. Courtney, P. N. Nehete, B. P. Nehete, P. Thapa, D. Zhou, and K. J. Sastry, "Alpha-galactosylceramide is an effective mucosal adjuvant for repeated intranasal or oral delivery of HIV peptide antigens," *Vaccine*, vol. 27, no. 25–26, pp. 3335–3341, May 2009.
- [204] S. L. H. van Dommelen, H. A. Tabarias, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti, "Activation of Natural Killer (NK) T Cells during Murine Cytomegalovirus Infection Enhances the Antiviral Response Mediated by NK Cells," *J. Virol.*, vol. 77, no. 3, pp. 1877–1884, Feb. 2003.
- [205] T. R. Johnson, S. Hong, L. Van Kaer, Y. Koezuka, and B. S. Graham, "NK T Cells Contribute to Expansion of CD8+ T Cells and Amplification of Antiviral Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus," *J. Virol.*, vol. 76, no. 9, pp. 4294–4303, May 2002.
- [206] K. Kakimi, L. G. Guidotti, Y. Koezuka, and F. V. Chisari, "Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 921–930, Oct. 2000.
- [207] L. P. Ho, L. Denny, K. Luhn, D. Teoh, C. Clelland, and A. J. McMichael, "Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and

- improves the disease course in influenza A virus infection,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 7, pp. 1913–1922, Jul. 2008.
- [208] J. D. Wesley, M. S. Tessmer, D. Chaukos, and L. Brossay, “NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection.,” *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 7, p. e1000106, Jul. 2008.
- [209] S. L. H. van Dommelen, H. A. Tabarias, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti, “Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells.,” *J. Virol.*, vol. 77, no. 3, pp. 1877–84, Feb. 2003.
- [210] P. O. Ilyinskii, R. Wang, S. P. Balk, and M. A. Exley, “CD1d mediates T-cell-dependent resistance to secondary infection with encephalomyocarditis virus (EMCV) in vitro and immune response to EMCV infection in vivo.,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 14, pp. 7146–58, Jul. 2006.
- [211] S. Huber, D. Sartini, and M. Exley, “Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis.,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 6, pp. 3147–53, Mar. 2003.
- [212] J. A. Hobbs *et al.*, “Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus.,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 22, pp. 10746–54, Nov. 2001.
- [213] P. M. Spence, V. Sriram, L. Van Kaer, J. A. Hobbs, and R. R. Brutkiewicz, “Generation of cellular immunity to lymphocytic choriomeningitis virus is independent of CD1d1 expression.,” *Immunology*, vol. 104, no. 2, pp. 168–74, Oct. 2001.
- [214] L.-P. Ho, L. Denney, K. Luhn, D. Teoh, C. Clelland, and A. J. McMichael, “Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 7, pp. 1913–22, Jul. 2008.
- [215] H.-J. Youn *et al.*, “A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and alpha-galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central nervous system.,” *Vaccine*, vol. 25, no. 28, pp. 5189–98, Jul. 2007.
- [216] A. J. Davison *et al.*, “The order Herpesvirales.,” *Arch. Virol.*, vol. 154, no. 1, pp. 171–7, Jan. 2009.
- [217] D. Chattopadhyay and M. T. H. Khan, “Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses,” *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 14, pp. 297–348, 2008.
- [218] D. P. Depledge, T. Sadaoka, and W. J. D. Ouwendijk, “Molecular aspects of varicella-zoster virus latency,” *Viruses*, vol. 10, no. 7, Jul. 2018.
- [219] L. Zerboni, N. Sen, S. L. Oliver, and A. M. Arvin, “Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 3, p. 197, Mar. 2014.
- [220] S. Balachandran *et al.*, “Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection.,” *Immunity*, vol. 13, no. 1, pp. 129–41, Jul. 2000.
- [221] C. Bogdan, “The function of type I interferons in antimicrobial immunity.,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 419–24, Aug. 2000.

- [222] J. E. Durbin *et al.*, “Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 8, pp. 4220–8, Apr. 2000.
- [223] C. A. Biron, K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather, “Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 17, pp. 189–220, Jan. 1999.
- [224] B. Grubor-Bauk, A. Simmons, G. Mayrhofer, and P. G. Speck, “Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 3, pp. 1430–4, Feb. 2003.
- [225] A. A. Ashkar and K. L. Rosenthal, “Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection,” *J. Virol.*, vol. 77, no. 18, pp. 10168–71, Sep. 2003.
- [226] B. Grubor-Bauk, J. L. Arthur, and G. Mayrhofer, “Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice,” *J. Virol.*, vol. 82, no. 22, pp. 11073–83, Nov. 2008.
- [227] A. L. Cornish, R. Keating, K. Kyparissoudis, M. J. Smyth, F. R. Carbone, and D. I. Godfrey, “NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 84, no. 1, pp. 13–9, Feb. 2006.
- [228] W. MT *et al.*, “The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 19, pp. 10913–10918, Sep. 2003.
- [229] S. D, D. M, S. M, B. T, K. K, and B. L, “Herpes simplex virus infection downmodulates NKG2D ligand expression,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 69, no. 5, pp. 429–436, May 2009.
- [230] L. LL, “NKG2D in innate and adaptive immunity,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 560, pp. 51–56, 2005.
- [231] K. C *et al.*, “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.*, vol. 41, no. 7, pp. 1913–1923, Jul. 2011.
- [232] B. CA, B. KS, and S. JL, “Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 320, no. 26, pp. 1731–1735, Jun. 1989.
- [233] O. T *et al.*, “IFN-gamma-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2,” *Blood*, vol. 106, no. 1, pp. 184–192, Jul. 2005.
- [234] S. S, A. AK, and R. BT, “Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells in the latently infected trigeminal ganglia,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 3, pp. 1703–1711, Feb. 2006.
- [235] P. XH, G. KY, S. JG, L. JQ, and P. RQ, “[Modulation of the rate of CD158a+/b+ cells by Th1-and Th2-like cytokines],” *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, vol. 19, no. 1, pp. 56–58, 2003.
- [236] M. MC, P. M, V. C, B. R, and M. L, “Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function,” *Hum. Immunol.*, vol. 61, no. 1, pp.

- 44–50, Jan. 2000.
- [237] L. P, W. PV, E. CK, van R. N, and C. E, “Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 3, pp. 1451–1460, Feb. 2007.
- [238] S. SH and W. RG, “Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells,” *J. Virol.*, vol. 76, no. 3, pp. 1071–1076, Feb. 2002.
- [239] E.-E. S, “Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus,” *Virol. J.*, vol. 2, Aug. 2005.
- [240] M. J. Smyth *et al.*, “Sequential production of interferon- γ by NK1.1 T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of galactosylceramide,” 2002.
- [241] Y. Hayakawa *et al.*, “IFN- γ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, α -galactosylceramide,” *Blood*, vol. 100, no. 5, pp. 1728–1733, Sep. 2002.
- [242] A. R *et al.*, “Interleukin-12 induces cytotoxic NK1+ alpha beta T cells in the lungs of euthymic and athymic mice,” *Immunology*, vol. 88, no. 1, pp. 82–89, 1996.
- [243] P. SH, K. T, B. A, and C. C, “The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 3, pp. 1197–1201, Feb. 2003.
- [244] K. I. Seino, S. Motohashi, T. Fujisawa, T. Nakayama, and M. Taniguchi, “Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications,” *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 807–812, Sep. 2006.
- [245] A. Ishikawa *et al.*, “A phase I study of α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1910–1917, Mar. 2005.
- [246] A. Ishikawa *et al.*, “A phase I study of α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1910–1917, Mar. 2005.
- [247] H. IF *et al.*, “NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 5140–5147, Nov. 2003.
- [248] L. C. A, V. K. L, and F.-D.-S. None, “CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators,” *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 7, pp. 322–327, Jul. 2006.
- [249] Q. G *et al.*, “High doses of alpha-galactosylceramide potentiate experimental autoimmune encephalomyelitis by directly enhancing Th17 response,” *Cell Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 480–491, Apr. 2010.
- [250] J. AW *et al.*, “Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 12, pp. 1789–1799, Dec. 2001.
- [251] S. AK *et al.*, “Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 12,

- pp. 1801–1811, Dec. 2001.
- [252] T. M, I. F, and M. S, “Clinical Application of iNKT Cell-mediated Anti-tumor Activity Against Lung Cancer and Head and Neck Cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018.
- [253] F. S *et al.*, “NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. DEC, 2013.
- [254] M. S and N. T, “Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases,” *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, vol. 1, no. 1, pp. 108–116, 2009.
- [255] M. S and N. T, “Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer,” *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 4, pp. 638–645, Apr. 2008.