

Agata Matejuk

Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, Francja

(Krajowe Centrum Badań Naukowych)

AUTOREFERAT

Orlean, Francja, sierpień 2013

Spis treści

I.	Posiadane stopnie naukowe.....	3
II.	Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych.....	3
III.	Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
IV.	Najważniejsze publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
V.	Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
1.	Wgląd w patologię doświadczalnego modelu stwardnienia rozsianego.....	5
1.1.	Wprowadzenie.....	5
1.2.	Cytokiny, chemokiny i ich receptory.....	6
1.3.	Immunoregulacja i neuroprotecyjne działanie estrogenu i jego pochodnych.....	8
1.4.	Różnice w efektywności terapii hormonalnej zależne od wieku.....	11
1.5.	Wadliwa immunoregulacja komórkowa w EAE i SM.....	11
1.6.	Nowe geny jako cel terapii w SM.....	14
1.7.	Zastosowanie terapii hormonalnej w leczeniu SM – badania kliniczne.....	17
VI.	Inne osiągnięcia naukowe.....	19
1.	Toczeń rumieniowaty układowy (SLE -systemic lupus erythematosus) - rola naturalnych autoprzeciwciał (NAA- Natural Autoantibodies).....	19
1.1.	Udział limfocytów B produkujących NAA w patologii toczenia.....	19
1.2.	Rola limfocytów B produkujących NAA w immunoregulacji.....	21
2.	Immunologia nowotworów.....	22
2.1.	Szczepionki celujące w neowaskularyzację nowotworow.....	22
2.2.	IP6 w terapii przeciwrakowej; przeszłość, terażniejszość i przyszłość.....	23
2.3.	MiR i normalizacja unaczynienia guza: wpływ na przeciwnowotworową odpowiedz immunologiczną.....	24
VII.	Literatura.....	26

I. Posiadane stopnie naukowe

- **Dyplom magistra analityki medycznej** uzyskany na Akademii Medycznej we Wrocławiu w 1991 roku
- **Dyplom doktora nauk biologicznych w dyscyplinie immunologii nowotworów** uzyskany w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN we Wrocławiu w 1997 roku
Tytuł pracy doktorskiej: „Udział lektyn endogennych w oddziaływaniach adhezyjnych komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna naczyniowego”
- **Dyplom habilitacyjny** uzyskany na Uniwersytecie w Orleanie (Francja) w 2012 roku

II. Dotychczasowe zatrudnienie

- **1994-1998; asystent** w Zakładzie Immunologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN we Wrocławiu
- **1998-2000; stażysta podoktorski** – Wydział Neurologii, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA. Laboratorium Prof. Haliny Offner i Prof. Arthura Vandenburga
- **2000-2005; adiunkt**, Wydział Neurologii, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA
- **2005-2006; adiunkt**, Wydział Patologii, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA
- **2006-2010; adiunkt i konsultant naukowy**, Wydział Patologii, University of Maryland, Baltimore, USA
- **2010-2011; adiunkt**, Wydział Chirurgii Plastycznej, Laboratorium Immunologii, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, USA
- **2011-obecnie; naukowiec LE STUDIUM®**, Instytut Badań Zaawansowanych, CNRS, Orlean, Francja

III. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Wgląd w patogenezę stwardnienia rozsianego i jego modelu zwierzęcego. Immunoregulacyjne i neuroprotektoryjne działanie estrogenu i jego pochodnych w leczeniu doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia”.

Na osiągnięcie to składa się 13 prac opublikowanych w czasopiśmie, których sumaryczny IF wynosi 48.941, liczba punktów MNiSW wynosi 341, a liczba cytowań wynosi 358.

IV. Najważniejsze publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Matejuk, A.**, Vandembark, A. A., Burrows, G.G., Bebo, B. F., JR and Offner, H.: "Reduced chemokine and chemokine receptor expression in spinal cords of TCR BV8S2 transgenic mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis with BV8S2 protein" *Journal of Immunol.* 2000, 164: 3924-31; (IF=5.520, pkt. MNiSW=32, ilość cytowań=22)¹
2. **Matejuk, A.**, Adlard, K., Zamora, A., Silverman, M., Vandembark A. A. and Offner, H.: "17 β -estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis" *Journal of Neurosci. Res.* 2001, 65: 529-542; (IF=2,974 pkt. MNiSW=27, ilość cytowań=72)²
3. **Matejuk, A.**, Dwyer, J., Zamora, A., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Evaluation of the effects of 17 β -estradiol on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray" *Endocrinology*, 2002, 143: 313-319; (IF=4.717 pkt. MNiSW=32, ilość cytowań=46)³
4. **Matejuk, A.**, Dwyer, J., Ito, A., Bruender, Z., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Effects of cytokine deficiency on chemokine expression in CNS of mice with EAE" *Journal Neurosci. Res.* 2002, 67: 680-688; (IF=2,974 pkt. MNiSW=27, ilość cytowań=24)⁴
5. **Matejuk, A.**, Buenafe, A. C., Dwyer, J., Ito, A., Silverman, M., Zamora, A., Vandembark, A. A., and Offner, H. "Endogenous CD4+BV8S2- T cells from TG BV8S2+ donors confer complete protection against spontaneous experimental encephalomyelitis (Sp-EAE) in TCR transgenic, RAG-/- mice" *Journal of Neurosci. Res.* 2003, 71: 89-103; (IF=2,974 pkt. MNiSW=27, ilość cytowań=9)⁵
6. **Matejuk, A.**, Hopke, C., Dwyer, J., Subramanian, S., Jones, R. E., Bourdette, D. N., Vandembark, A. A. and Offner, H. "CNS gene expression pattern associated with spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis" *Journal of Neurosci. Res.* 2003, 73: 667-678; (IF=2,974 pkt. MNiSW=27, ilość cytowań=17)⁶
7. **Matejuk, A.**, Dwyer, J., Hopke, C., Vandembark, A.A. and Offner, H. "17 β -estradiol treatment profoundly down regulates gene expression in spinal cord tissue in mice protected from experimental autoimmune encephalomyelitis" *Arch. Imm. Ther. Exp.* 2003, 51: 185-193; (IF=2,378 pkt. MNiSW=13, ilość cytowań=11)⁷
8. **Matejuk, A.**, Ito, A., Hopke, C., Drought, H., Dwyer, J., Zamora, A., Subramanian, S., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Transfer of severe EAE by IL-12 & IL-18 potentiated T cells is estrogen sensitive" *Journal of Immunol.* 2003, 170: 4802-4809; (IF=5.520, pkt. MNiSW=32, ilość cytowań=30)⁸
9. Subramanian, S., **Matejuk, A.**, Zamora, A., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system" *Journal of Immunol.* 2003, 170: 1548-55; (IF=5.520, pkt. MNiSW=32, ilość cytowań=66)⁹

10. **Matejuk, A.**, Bakke, A. C., Hopke, C., Dwyer, J., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Estrogen-treatment induces a novel population of regulatory cells, which suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis" *Journal of Neurosci Res.* 2004, 77: 119-26; (IF=2,974 pkt. MNiSW=27, ilość cytowań=23)¹⁰
11. **Matejuk, A.**, Dwyer, J., Hopke, C., Vandembark, A. A. and Offner, H. "Opposing roles for TGF- β 1 and TGF- β 3 isoforms in experimental autoimmune encephalomyelitis" *Cytokine* 2004, 25: 45-51; (IF=2,518 pkt. MNiSW=20, ilość cytowań=8)¹¹
12. **Matejuk, A.**, Hopke, C., Vandembark, A. A., Hurn, P. D. and Offner, H. "Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy" *Journal of Immunol.* 2005, 174: 2387-95; (IF=5.520, pkt. MNiSW=32, ilość cytowań=27)¹²
13. **Matejuk, A.** & Afentoulis, M. "Association of CD45^{dim}VLA-4⁺ cells with the NKT cell lineage and their selective expression of IL-13, IP-15 and CCR3 transcripts" *Arch. Imm. Ther. Exp.* 2006, 54: 183-91; (IF=2,378 pkt. MNiSW=13, ilość cytowań=3)¹³

V. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1. Wgląd w patologię doświadczalnego modelu stwardnienia rozsianego

1.1. Wprowadzenie

Stwardnienie rozsiane (SM, Sclerosis Multiplex) jest przewlekłą, autoimmunologiczną i demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o nieznannej etiologii i patogenezie. Uważa się, że zarówno czynniki genetyczne, środowiskowe jak i immunologiczne przyczyniają się do patologii SM. Szacuje się, że dotkniętych tą chorobą jest ponad 2,5 miliona osób na całym świecie. W krajach rozwiniętych jest jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności ludzi młodych. Rozwinięta choroba ostatecznie prowadzi do inwalidztwa i śmierci. Niszczenie osłonek mielinowych nerwów spowodowane jest chronicznym stanem zapalnym, będącym konsekwencją zarówno humoralnej jak i komórkowej odpowiedzi autoreaktywnych komórek. Kobiety zapadają średnio dwukrotnie częściej na choroby autoimmunologiczne niż mężczyźni. Nieco paradoksalnym aczkolwiek intrygującym z punktu widzenia naukowego jest fakt, że w przypadku SM, w okresie ciąży aktywność choroby zanika a nawrót pełnoobjawowego SM pojawia się dopiero w pierwszym trymestrze po porodzie, gdzie następuje spadek hormonów płciowych takich jak 17 β -estradolu (E2) i estriolu (E3)¹⁴. Pomimo rzadszego występowania SM u mężczyzn nasilenie choroby jest bardziej dotkliwe, co na ogół koreluje z obniżonym poziomem testosteronu (T4) w surowicy krwi¹⁵⁻¹⁷. Ochronne działanie hormonów płciowych wskazywałoby na możliwość terapii SM niektórymi formami estrogenu i testosteronu¹⁸⁻²¹.

Zwierzęcym modelem SM jest doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - EAE). Chorobę u podatnych zwierząt doświadczalnych wywołuje się przez immunizację antygenami lub peptydami mielinowymi lub poprzez bierne przeniesienie za pomocą autoreaktywnych, encefalitogennych limfocytów T swoistych dla antygenów mielinowych. EAE obejmuje złożony proces chorobowy, który inicjowany jest przez aktywację autoreaktywnych limfocytów T wytwarzanych w ogólnoustrojowych narządach limfatycznych i ich migrację do OUN. W OUN następuje dalsza aktywacja limfocytów i wydzielanie czynników prozapalnych, cytokin, chemokin i

aktywacja ich receptorów. Wytworzony stan zapalny pobudza inne komórki układu immunologicznego (limfocyty T i B, makrofagi) do odpowiedzi przeciwko własnym tkankom. Aktywowane makrofagi, a także komórki mikrogleju posiadające właściwości fagocytarne i prezentujące antygen, oprócz nadekspresji cząsteczek MHC klasy II, ostatecznie fagocytują mielinę powodując demielinizację aksonów i progresywne niszczenie osłonki mielinowej. EAE jest przydatnym zwierzęcym modelem doświadczalnym, który dostarcza ważnych informacji na temat patogenezы SM.

1.2. Cytokiny, chemokiny i ich receptory

Pierwszym etapem w rozwoju EAE jest aktywacja encefalitogennych limfocytów T specyficznych dla białek mieliny, a następnie ich różnicowanie się w kierunku Th1, które wytwarzają duże ilości cytokin prozapalnych, takich jak: IFN- γ , IL-2, TNF- α czy limfotoksyna^{22,23}. W świetle najnowszych badań uważa się, że równie ważne w inicjowaniu i podtrzymywaniu choroby są limfocyty Th17, po raz pierwszy opisane przez Aggarwala i wsp. w 2003 roku²⁴. Przykładami silnych induktorów komórek Th1 są cytokiny IL-12 i IL-18. IL-12 stymuluje różnicowanie limfocytów w kierunku Th1 bezpośrednio lub pośrednio poprzez indukcję IFN- γ ^{25,26}. Inny mechanizm różnicowania limfocytów w kierunku Th1 posiada IL-18, który oddziałując na komórki CD3⁺/CD4⁺ i NK zwiększa produkcję TNF- α ^{27,28}. IL-12 i IL-18 są uznane jako cytokiny mające zdolność pobudzania produkcji IFN- γ równocześnie w limfocytach T jak i komórkach NK²⁹⁻³¹ i zostały uznane za istotne czynniki regulujące powstawanie oraz przebieg EAE. Podanie przeciwciał przeciwko IL-12 i IL-18 wyciszało indukcję EAE^{32,33} a myszy z nieuczynnionym genem dla IL-12 i IL-18 były odporne na powstawanie EAE^{34,35}. Kluczową rolę dla IL-12 w patogenezы EAE wykazano u myszy z unieczynnionym genem dla IL12p40, u których komórki T nie są w stanie wytworzyć IFN- γ ^[57]. IL-18 działa prozapalnie poprzez stymulację białka zapalnego dla makrofagów-1 α (MIP-1 α), chemoatraktanta dla monocytów-1 (MCP-1) i TNF- α wytwarzanych przez limfocyty T CD3⁺ i CD4⁺ a także komórki NK, i dalszą indukcję IL-8 i IL-1 β ²⁸. Myszy transgeniczne z nadprodukcją IL-18 mają w śledzionie zwiększoną liczbę CD4⁺ limfocytów T i niezmienną ilość komórek CD11b⁺ wytwarzających TNF- α ⁺ (nasze niepublikowane obserwacje). Myszy pozbawione IL-18 nie posiadają autoreaktywnych komórek Th1 i autoprzeciwciał i są odporne na indukcję EAE za pomocą mielinowej glikoproteiny oligodendrocytów (MOG35-55)³⁵. W naszych badaniach ocenialiśmy wpływ IL-18 i IL-12 na autoreaktywność i specyficzność limfocytów T dla MOG35-55 i ich zdolność do biernego przekazywania EAE^[11]. Nasze wyniki wskazują na kluczową rolę dla IL-12 i IL-18 w pobudzaniu aktywności i agresywności komórek T. Aktywacja limfocytów T w obecności IL-12 powodowała preferencyjną aktywację IFN- γ i CCR5, natomiast IL-18 powodowała selektywną aktywację TNF- α , CCR4 i CCR7. Pobudzanie komórek T, IL-12 lub IL-18 skutkowało przekazaniem jedynie klinicznie i histologicznie łagodnej formy EAE. Natomiast połączenie obu cytokin wywoływało chorobę o bardzo ostrym i agresywnym przebiegu. Nasze wyniki wskazują na współdziałanie IL-12 i IL-18 w wywołaniu autoagresywnej formy EAE. Pomimo tego, że selektywną regulację CCR5 przez IL-12 obserwowano już wcześniej^{36,37} my wykazaliśmy istotę tej zależności w przypadku limfocytów T specyficznie rozpoznających MOG. Ponadto wykryliśmy wpływ IL-18 na obniżenie ekspresji CCR, które charakterystyczne są dla przebiegu EAE (CCR1 i CCR2 i CCR5¹) i pobudzenie ekspresji CCR4 i CCR7. Jest to pierwsze doniesienie wykazujące zależność ekspresji CCR4 i CCR7 od IL-18.

Transformacyjne czynniki wzrostu- β (TGF- β) to wielofunkcyjne cytokiny, cząsteczki pleiotropowe o kluczowej roli w różnicowaniu, proliferacji i migracji komórek a także metabolizmie pozakomórkowej macierzy oraz immunosupresji³⁸. Są niezbędne zarówno w różnicowaniu patogennych komórek Th17 jak i regulatorowych komórek Tregs. TGF- β s

stanowią rodzinę cytokin składającą się z trzech ściśle powiązanych izoform: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. TGF- β s obficie występują w układzie nerwowym i zostały opisane jako czynniki wzrostu aktywowane uszkodzeniem tkanki³⁹⁻⁴². W mózgu, TGF- β s przyczyniają się do ogólnego stanu zapalnego w EAE⁴³, uszkodzenia astrocytów⁴⁴ i aktywacji komórek śródbłonna⁴⁵. W OUN, źródłem TGF- β są neurony, astrocyty i komórki mikrogleju⁴⁰. Nie ma jednoznacznych doniesień naukowych o ekspresji poszczególnych izoform TGF- β podczas przebiegu i remisji EAE. Naszym celem było przebadanie roli poszczególnych form TGF- β u samic naiwnych (nie poddanych immunizacji), immunizowanych z pełnoobjawowym EAE i u osobników chronionych przed chorobą działaniem hormonów (17- β estradiol-E2)¹¹. Wykazaliśmy odwrotną zależność między ekspresją TGF- β 1, którego poziom był znacznie podwyższony u myszy z EAE a TGF- β 3, którego ekspresja znacznie korelowała z ochronnym działaniem E2. TGF- β 3 był specyficznym ekspresjonowany w śledzionie a TGF- β 1 w OUN jako produkt komórek CD3+ i Mac-1+. Kluczowe znaczenie miało odkrycie, że TGF- β 3 wykazuje hamujące właściwości odnośnie proliferacji autoreaktywnych komórek *in vitro*. Nasze badania wykazały, że poszczególne izoformy TGF- β mogą posiadać odrębną funkcję biologiczną i zdolność kształtowania odpowiedzi immunologicznej.

Chemokiny, rozpuszczalne czynniki chemotaktyczne, zawiadują kierunkową migracją różnych typów komórek zapalnych w tym neutrofilii, makrofagów, limfocytów T i B, eozynofili, basophilii^{46,47} i komórek tucznych⁴⁸. Chemokiny posiadają znaczącą rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Podwyższoną ekspresję MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES i IP-10 stwierdzono w OUN u chorych z SM i zwierząt z EAE^{1,49-53}. Głównym ich źródłem są komórki jednojądrzaste, jak również komórki OUN, w tym komórki mikrogleju, astrocyty i komórki śródbłonna naczyńniowego^{53,54}. Unieczynnienie MIP-1 α i MCP-1 z użyciem przeciwciał monoklonalnych powstrzymywało rozwój choroby^{50,55,56}. Znacznie mniej wiadomo na temat ekspresji receptorów dla chemokin w przebiegu SM i EAE. Podwyższone ilości CCR2 i CCR5 znaleziono w rdzeniu kręgowym (SC) u szczurów wykazujących objawy kliniczne EAE⁵⁷. W mózgu pacjentów z SM naciekające komórki T charakteryzowały się ekspresją CCR5 i CXCR3, co szło w parze ze zwiększoną ekspresją ich ligandów czyli MIP-1 α , RANTES i IP-10^{58,59}. Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym laboratorium na myszach transgenicznych (Tg), w których limfocyty T specyficznie rozpoznają fragment (NAc1-11) białka zasadowego mielinu (MBP) wykazały, że można zahamować objawy EAE poprzez indukcję regulatorowych limfocytów T. Transgeniczne komórki T posiadają łańcuch TCR- β -BV8S2 w połączeniu z naturalnie zaaranżowanymi łańcuchami α . Szczepienie za pośrednictwem heterologicznego białka BV8S2 powodowało dojrzewanie komórek regulatorowych T specyficznych dla BV8S2, zahamowanie odpowiedzi komórek Th1 przeciw białkom MBP oraz ochronę przed EAE. Z wyciszeniem objawów EAE wiązał się spadek produkcji IFN- γ przez autoreaktywne limfocyty T i zwiększone wytwarzanie IL-10 przez limfocyty regulatorowe w węzłach chłonnych (LN). W naszym kolejnym badaniu, sprawdzaliśmy poziomy ekspresji różnych chemokin: jednej chemokiny z rodziny C (LTN), sześciu chemokin z rodziny C-C (RANTES, eotaksyny, MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1 i TCA-3), i dwóch chemokin CXC (IP-10 i MIP-2) równoległe z ich receptorami (CCR1, CCR1b, CCR2, CCR3, CCR4 i CCR5) w OUN i obwodowo w LN myszy z EAE i myszy, które poddane były szczepieniu białkiem heterologicznym¹. Uzyskane wyniki z tego badania dostarczają ważnych spostrzeżeń. Po pierwsze, u myszy kontrolnych (sparaliżowanych), ekspresja chemokin RANTES, IP-10 i MCP-1 była znamienne podwyższona w SC i na znacznie wyższym poziomie niż w mózgu lub LN. Chemokiny takie jak: MIP-1 β , MIP-1 α , MIP-2 cechowały się specyficznością tkankową, gdyż występowały w SC, ale nie były wykrywalne w mózgu. Zarówno w tkance SC jak i mózgu obserwowaliśmy znacznie zwiększoną liczbę komórek zapalnych i limfocytów T na mg tkanki, niemniej komórkowa infiltracja była około 4 razy większa w SC niż w mózgu. W SC u myszy ze

zredukowanymi objawami choroby obserwowano zmniejszony napływ komórek zapalnych i współmiernie zmniejszoną ekspresję zapalnych chemokin i ich receptorów, zwłaszcza CCR1, CCR2 i CCR5. Natomiast w mózgu obserwowaliśmy obniżony poziom CCR1 bez zmian w ekspresji CCR2, CCR5, RANTES, IP-10 i MCP-1. Istotne było odkrycie, że poprzez szczepienie ochronne TCR wzrosła ekspresja CCR3 i CCR4, które są charakterystyczne dla odpowiedzi typu Th2. W LN, wzrosła ekspresja MIP-1 β i MIP-2, a zmianom nie uległa ekspresja RANTES, IP-10, MIP-1 α , LTN i receptorów dla chemokin. Nasze wyniki wskazują, że podwyższona produkcja chemokin zapalnych jest zależna od tkanki, a nie tylko od ilości infiltrujących komórek jednojądrzastych.

Chociaż zarówno cytokiny jak i chemokiny odgrywają kluczową rolę w patogenezie EAE i przyczyniają się do klinicznych i histologicznych zmian, ich wzajemna interakcja *in vivo* nie została jeszcze jasno określona. W kolejnym projekcie podjęliśmy próbę oceny ekspresji chemokin i receptorów dla chemokin w OUN u myszy dzikiego typu i myszy z nieuczynnionymi genami (knock out) dla niektórych cytokin w ostrej fazie EAE indukowanego peptydem MOG-35-55 i CFA⁴. Nasze wyniki wskazują na: 1) kluczową rolę TNF- α w patogenezie EAE, gdyż brak tej cytokiny wpływał supresyjnie na ekspresję większości chemokin i ich receptorów co znacznie łagodziło przebieg choroby, a u niektórych myszy wywoływało nawet całkowitą oporność na indukcję EAE; 2) mniej istotną rolę innych cytokin, gdyż ich brak nie miał istotnego wpływu na kliniczny przebieg EAE; 3) istnienie nierozzerwalnego związku między ekspresją MIP-1 α , MIP-2 a MCP-1 w OUN; 4) makrofagi i limfocyty T CD8⁺ jako główne źródło większości chemokin w OUN u chorych myszy; 5) zależność ekspresji RANTES i MIP-1 α od TNF- α i ekspresji MCP-1 od IL-4. Nasze wyniki nie tylko wskazują zależności cytokinowo-chemokinowe czy charakteryzują ich komórkowe źródła w OUN, ale także podkreślają rolę MIP-1 α , MIP-2 i MCP-1 w kontrolowaniu przebiegu i nasilenia EAE oraz stanów zapalnych w OUN podczas choroby.

1.3. Immunoregulacja i neuroprotecyjne działanie estrogenu i jego pochodnych

Liczne dowody naukowe sugerują, że hormony płciowe odgrywają kluczową rolę w różnicach wrażliwości na choroby autoimmunologiczne pomiędzy kobietami a mężczyznami. Hormony wpływają w różny sposób na przebieg chorób z autoagresji. Na przykład w okresie ciąży objawy SM i reumatoidalnego zapalenia stawów (rheumatoid arthritis–RA) w przeciwieństwie do toczenia rumieniawego (Systemic Lupus Erythematosus–SLE) są znacznie złagodzone i ponownie nasilają się po porodzie, co koreluje z obniżonym poziomem hormonów płciowych. Z badań z użyciem doświadczalnych modeli zwierzęcych staje się coraz bardziej jasne, że sterydy płciowe regulują choroby autoimmunologiczne. Wpływ hormonów płciowych na różnice w zapadalności i przebieg EAE były znane od wielu lat. Chociaż dokładny mechanizm wpływu hormonów płciowych pozostaje nadal słabo poznany bezsprzecznym pozostaje fakt regulacji reakcji autoimmunologicznych przez estrogeny i testosteron. Na przykład myszy szczepu SJL uderzająco dobrze naśladują różnice płci w przebiegu EAE obserwowane w SM⁶⁰⁻⁶⁴. Sugeruje się, że ta różnica płci jest wynikiem ochronnego działania testosteronu, gdyż kastracja samców wpływała na wzrost wrażliwości na różnorodne choroby autoimmunologiczne⁶⁵⁻⁶⁸. Dane wskazują, że fizjologiczne stężenia endogennych androgenów mogą pełnić ochronną rolę u mężczyzn. W przypadku EAE ciąża chroni przed EAE^{69,70}, a estrogen w dawkach charakterystycznych dla ciąży tłumy kliniczne objawy EAE u myszy i szczurów^{71,72}. Ponadto owariektomia u samic wzmacniała przebieg choroby a leczenie estrogenami hamowało rozwój EAE^{2,73}. Ochronną rolę w przypadku EAE i zwierzęcego modelu dla ludzkiego reumatoidalnego zapalenia stawów wykazano w naszym i innych laboratoriach, dla związków estrogenowych takich jak 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) a także syntetycznych i naturalnych pochodnych dehydroepiandrosteronu (DHEA) o

nazwie: HE2200 i HE2500^{2,73-75}. Dodatkowo, w naszym laboratorium wykazaliśmy po raz pierwszy ochronny wpływ podawanego doustnie 17 α -etynyloestradolu (EE), pół-syntetycznego estrogenu, który jest składnikiem środków antykoncepcyjnych, na przebieg EAE. W przeciwieństwie do leczenia E2, które jest najbardziej skuteczne, gdy rozpoczęte jest przed wystąpieniem objawów klinicznych, EE hamuje rozwój już zainicjowanej choroby. Leczenie EE znacząco zmniejszało wydzielanie chemokin i cytokin prozapalnych (IFN- γ , TNF- α i IL-6) przez aktywowane limfocyty T, a także ekspresję kluczowej metaloproteinazy macierzy komórkowej (MMP-9), zmniejszało poziom IgG2a i zwiększało ekspresję TGF- β 3 w CUN⁹.

Liczne badania wykazały bezpośrednie działanie hormonów płciowych na komórki odpornościowe. Ogólnie trudno jest wykazać wpływ hormonów płciowych na komórki układu immunologicznego w warunkach *in vitro*, natomiast w warunkach *in vivo* wpływ ten jest wyrazisty. Jak już wspomniałam wyżej, znaczenie hormonów płciowych na powstawanie chorób autoimmunologicznych z dużym powodzeniem wykazano w doświadczalnych modelach zwierzęcych^{2,8,62,63,73,76,77}. Z badań *in vivo* wiemy, że estrogen wpływa bezpośrednio lub pośrednio na wiele różnych typów komórek, w tym na komórki B^{78,79}, komórki T^{79,80}, makrofagi^{81,82}, komórki NK^{83,84}, eozynofile⁸⁵, komórki podścieliska⁸⁶ i komórki śródbłonna naczyniowego^{87,88}. W zależności od typu komórek, efekty leczenia estrogenami mogą przejawiać się jako zmiany w produkcji cytokin, różnicowania komórek i ekspresji cząsteczek adhezyjnych. W badaniach *in vitro* wykazano, że estrogeny mogą hamować proliferację komórek stymulowanych mitogenami czy specyficznymi antygenami, hamować aktywność limfocytów supresorowych^{89,90}, a także hamować reakcje nadwrażliwości typu późnego (DTH)⁹¹. Leczenie estrogenami ma wpływ na produkcję cytokin, w tym IL-1⁹², IL-6⁹³, TNF- α ⁹⁴ i IFN- γ ⁹⁵ w różnych populacjach komórkowych w tym ludzkich limfocytach T CD4^{+96,97}. W naszych badaniach wykazaliśmy, że leczenie estrogenami ma wpływ na liczbę komórek produkujących TNF- α oraz, w mniejszym stopniu, IFN- γ (komórki T, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki mikrogleju)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ponadto odkryliśmy, że estrogeny zarówno w śledzionie jak i OUN, silnie wpływają na transkrypcję genów kodujących kompleks zgodności tkankowej, cytokiny, chemokiny i ich receptory, cząsteczki adhezyjne, białka przekazujące sygnały komórkowe i wiele innych^{2,3,7}.

W zależności od mysiego modelu wrażliwość na terapię estrogenową jest zróżnicowana i łączy w sobie zarówno szlaki sygnałowe zależne i niezależne od estrogenu. Np. w naszych badaniach z użyciem myszy transgenicznych TCR BV8S2 ze szczepu B10.PL duże dawki estrogenu (15mg pigułka podawana podskórną, utrzymująca w surowicy ciążyowy poziom estrogenu) hamowały rozwój EAE o ok. 65%, a dawki mniejsze (pigułka zawierająca 0.36mg co odpowiada poziomowi hormonów w okresie rui) miały jedynie umiarkowany wpływ na EAE (33% zahamowania)¹⁰¹. W tym ostatnim przypadku, terapia estrogenowa wspomagana terapią z zastosowaniem TCR okazała się całkowicie (100%) skuteczna w zahamowaniu choroby, głównie poprzez indukcję cytokin wydzielanych przez supresorowe limfocyty T. Kolejnym etapem naszych badań była ocena wpływu małych dawek estrogenu na poziom ekspresji chemokin i cytokin oraz ich receptorów w transgenicznym modelu mysim TCR BV8S2². Wykazaliśmy, że całkowita utrata hormonów jajnikowych poprzez ich usunięcie, powodowała rozwinięcie ciężkiej formy EAE oraz znaczny wzrost MIP-1 α i MIP-2, będące głównie produktem naciekających komórek jednojądrzastych w SC. Co więcej, podanie owarietomizowanym myszom estrogenu blokowało ekspresję MIP-1 α i MIP-2 oraz rozwój choroby. Obserwacje te wskazują, że estrogeny posiadają naturalne właściwości obniżania stanu zapalnego w części poprzez wpływ na produkcję tych dwóch zapalnych chemokin. MIP-1 α działa głównie na monocyty/makrofagi i limfocyty⁴⁷. Wpływ estrogenu na MIP-1 α jest przedmiotem szczególnego zainteresowania ze względu na wykazane znaczenia tej chemokiny w patogenezie początkowej, ostrej fazy EAE⁵⁰. MIP-2, który

głównie oddziałuje na neutrofile, najwyraźniej nie gra klinicznie istotnej roli na tym etapie choroby, gdzie kluczową rolę odgrywają komórki jednojądrzaste⁵⁰. Ostra neutrofilia w OUN była opisana w przypadkach ostrej progresywnej formy EAE i SM^{102,103}. Kolejnym ważnym doniesieniem z naszych badań jest fakt, że niskie dawki estrogenów niemal całkowicie hamowały ekspresję wielu czynników zapalnych, w tym chemokin: RANTES, IP-10, MCP-1, MIP-1 α i MIP-2, receptory dla chemokin: CCR1 i CCR2 i CCR5 i cytokiny LT- α , TNF- α i IFN- γ , pomimo klinicznie manifestującego się EAE. Ta rozbieżność pomiędzy umiarkowanym efektem estrogenu na kliniczny przebieg EAE a silnym oddziaływaniem przeciwzapalnym sugeruje współdziałanie czynników estrogenozależnych i niezależnych. Nieznaczny wpływ estrogenu na proliferację i wydzielanie cytokin przez komórki T specyficzne dla MBP-AC1-11 wskazywałoby, że właśnie autoagresywne limfocyty są elementem niezależnym od estrogenu. Badania przeprowadzone przez Gilmore i Correale^{96,97} wykazały, że niskie dawki estradiolu i innych hormonów steroidowych miały zasadniczo nieistotny wpływ na wydzielanie wielu cytokin przez limfocyty T specyficznych dla białka proteolipidowego mieliny (PLP-proteolipid protein) u chorych z SM pomimo, że cięższe i wyższe stężenia estradiolu zwiększały produkcję IL-10 i IFN- γ . Odwrotnie, silny hamujący wpływ estrogenów na produkcję czynników zapalnych zwraca uwagę na komórki zapalne rekrutowane w miejsca uszkodzeń OUN jako element zależny od estrogenów. W szczególności, ogólnoustrojowy wpływ estrogenu na poziom CCR1 i CCR5 może ograniczać nabór limfocytów T o fenotypie CD45RAhi/CD4+, które są znane jako główne źródło cytokin zapalnych w OUN u gryzoni z EAE²², a także innych krążących komórek jednojądrzastych ekspresjonujących te receptory. Dodatkowo, według wcześniejszych badań¹⁰⁴, estrogen ma zdolność obniżania ekspresji MCP-1 i jego receptora CCR2 w OUN. Należy zauważyć, że unieczynnienie MCP-1 wyrażało się złagodzeniem nawracającej fazy choroby a nie miało wpływu na przebieg jej ostrej fazy⁵⁶, co wskazuje na istotną rolę tej chemokiny w podtrzymywaniu EAE. Wreszcie, należy zwrócić uwagę na fakt, że estradiol podawany w dawkach występujących w tabletkach antykoncepcyjnych hamuje stany zapalne zależne jak i niezależne od limfocytów T⁹⁵. Przeciwzapalne właściwości estrogenów przypominają działanie kortykosterydów, takich jak metyloprednizolon, które są powszechnie stosowane w celu ograniczenia skutków epizodycznych przy nawrotach SM, z jednoczesnym niewielkim wpływem na dalszy rozwój choroby^{105,106}. Komórkami odpowiadającymi na pozytywne działanie estrogenu wydają się komórki regulatorowe T CD4⁺ specyficzne dla TCR BV8S2¹⁰⁷. Nasze poprzednie badania wykazały, że niskie dawki estrogenu mają wpływ na indukcję regulatorowych limfocytów T poprzez promowanie produkcji supresorowych cytokin, w tym IL-10¹⁰¹. Podsumowując, nasze badania wskazują na minimalny wpływ estrogenu na autoreaktywne komórki Th1, które zapoczątkowują EAE, a raczej hamujący wpływ na komórki wtórnie rekrutowane do miejsc zapalnych. Estrogen obniżając ekspresję receptorów dla chemokin na tych komórkach przyczynia się do obniżonej ich zdolności do migracji i zasiedlania OUN i tym samym redukcji stanu zapalnego. Jednak oczywiste jest, że niskie dawki estrogenu mają niewielki wpływ na aktywację komórek T specyficznych dla MBP-AC1-11, a tym samym nie są w stanie zapobiec efektom działania tych limfocytów, które są zdolne do wywołania EAE nawet przy braku rekrutacji komórek wtórnych¹⁰⁸. Wyniki tych badań wskazują na efektywność terapii skojarzonych, gdzie łączy się blokowanie aktywności autoreaktywnych limfocytów z silnymi właściwościami przeciwzapalnymi estrogenów i które mogą potencjalnie prowadzić do wielu różnorodnych strategii leczenia SM.

1.4. Różnice w efektywności terapii hormonalnej zależne od wieku

Chociaż występowanie SM u mężczyzn jest rzadsze i na ogół manifestuje się w późniejszym okresie życia, niż u kobiet, choroba ma przebieg bardziej agresywny co koreluje z obniżonym poziomem testosteronu (T4) i wskazuje na ochronną rolę endogennych androgenów. Niewiele wiadomo na temat dominacji i stabilności szlaków metabolicznych, hormonalnych i skuteczności hormonalnej terapii zastępczej u mężczyzn i kobiet w okresie adeno i menopauzy charakteryzujących się spadkiem poziomu hormonów płciowych¹⁰⁹. Mechanizmy prowadzące do obniżonej produkcji androgenów i komórkowej wrażliwości na androgeny są słabo poznane. U gryzoni rozmieszczenie receptora androgenowego (AR) w rdzeniu kręgowym nie zostało jeszcze dobrze opisane, natomiast wiemy, że ligand dla AR jest wszechobecny w obszarach mózgu niezwiązanych z funkcją rozrodczą, takich jak kora mózgowa, hipokamp, jądra podstawne mózgu^{110,111}, aksony i dendryty przodomózgowia¹¹². U młodych mężczyzn testosteron jest głównie przekształcany w dihydrotestosteron (DHT), będący silnym aktywatorem AR. Szlak przekształcenia T4 do DHT słabnie z wiekiem i podczas andropauzy głównym szlakiem metabolizmu T4 jest jego przekształcanie do E2.

Do tej pory, prawie wszystkie badania z zastosowaniem EAE (i innych modeli zwierzęcych), w tym badania wpływu hormonów płciowych, prowadzone są wyłącznie na osobnikach młodych. Istnieje duża luka w naszej wiedzy o konsekwencjach andro- i menopauzy na progresję chorób autoimmunologicznych oraz skuteczność terapii hormonalnej. Podjęliśmy projekt w celu rozumienia skutków starzenia się na przebieg EAE i jego wpływ na terapię hormonalną.

Wyniki prezentowane przez nas na myszach szczepu C57BL/6 wykazują uderzające różnice między samcami w zależności od wieku zarówno w klinicznym przebiegu EAE jak i odpowiedzi na leczenie, zarówno testosteronem jak i estrogenem¹². Osobniki w średnim wieku charakteryzowały się ciężką i przewlekłą formą EAE. Posiadały zaburzoną dystrybucję komórek immunokompetentnych w śledzionie i SC oraz znacznie przyhamowaną aktywność limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺. Przede wszystkim posiadały znacznie obniżoną liczbę śledzionowych limfocytów T CD4⁺, które zasadniczo cechowały się słabą zdolnością do proliferacji i zwiększoną liczbą makrofagów oraz komórek z wysoką ekspresją MHC klasy II aktywnie wydzielających prozapalne mediatory: IFN- γ i MCP-1. Co ciekawe, osobniki te zupełnie niewrażliwe na działanie T4, dobrze reagowały na ochronne działanie E2. W przeciwieństwie, młode osobniki były całkowicie chronione przez działanie zarówno T4 jak i E2. T4 u młodych osobników hamował proliferację limfocytów T specyficznych dla MOG35-55 oraz wydzielanie TNF- α i IFN- γ . Ochronne efekty T4, w warunkach zarówno *in vivo* i *in vitro* były zahamowane przez flutamid, antagonistę AR, co wskazuje, że hormon działał właśnie poprzez AR. Terapia hormonalna T4 u osobników w średnim wieku była nieskuteczna zarówno w kontekście zmian morfologicznych, histopatologicznych jak i wpływu na komórki immunokompetentne. Jest to pierwsza publikacja zwracająca uwagę na różnice w zachorowalności na EAE i wrażliwości na terapię hormonalną u osobników męskich w zależności od wieku. Mimo, że leczenie testosteronem u mężczyzn z SM przedstawia się obiecująco, wyniki naszych badań przestrzegają, że strategia ta może być nieskuteczna u starszych mężczyzn. Wydaje się zasadnym, aby przeprowadzać wstępne badania w tej populacji chorych na SM do oceny potencjału immunoregulacji T4 przed rozpoczęciem leczenia.

1.5. Wadliwa immunoregulacja komórkowa w EAE i SM

W patogenezie SM, równowaga między autoreaktywnymi i supresorowymi komórkami jest decydującym krokiem w indukcji, rozwoju i progresji choroby. Uszkodzoną immunoregulację komórkową obserwowano w nawracającym i postępującym SM^{113,114}.

Komórki T CD4⁺ odgrywają pierwszoplanową rolę w zapobieganiu SP-EAE^{115,116}, jak również innych spontanicznych, doświadczalnych modelach zwierzęcych z autoagresją, takich jak szczurzy BB/W lub myszy model cukrzycy typu I (NOD)^{117,118}. Hemizygotyczne podwójnie transgeniczne myszy ekspresjonujące współzintegrowane łańcuchy TCR α i β i specyficzne dla peptydu zasadowego białka mieliny (MBP)-AC1-11 zawierają wysoki procent (> 98%) klonotypowych komórek T CD4⁺ i dlatego tylko niewielki procent tych myszy rozwija spontaniczną formę EAE^{115,119}. Myszy podwójnie transgeniczne RAG-1⁺ (T/R⁺) nie rozwijają Sp-EAE ze względu na obecność bardzo małej populacji (około 2%) limfocytów nietransgenicznych, specyficznych dla innych TCR. Aby zbadać mechanizmy regulacyjne, które naturalnie zapobiegają chorobom autoimmunologicznym, zastosowaliśmy podwójnie transgeniczny myszy model RAG-1^{-/-} (T/R-) ze specyficznością dla MBP i zdolnością do inicjowania spontanicznej formy EAE (SP-EAE). Tę formę EAE można zablokować poprzez transfer komórek śledziony z immunokompetentnej myszy. Nasze badania charakteryzują i opisują trzy różne subpopulacje komórek T, które pojawiają się u myszy T/R⁺ po immunizacji peptydem MBP-AC1-11 i które wykazują działanie ochronne przeciw EAE u myszy T/R⁻, jak i subpopulację CD4⁻CD8⁺BV8S2⁺, która nie wykazuje działania ochronnego⁵. Ochronne subpopulacje komórek T różniły się ekspresją genów V dla części zmiennych TCR, odpowiedzią na stymulację peptydem MBP-AC1-11, a także ekspresją chemokin i ich receptorów. Stwierdziliśmy, że 1) komórki T, o najsilniejszych właściwościach ochronnych przeciwko Sp-EAE, charakteryzowały się zróżnicowanym panelem genów α V i β V, i ekspresją CCR4, nie odpowiadały na stymulację peptydem MBP-AC1-11, wytwarzały zarówno IFN- γ jak i IL-10 oraz umiarkowane ilości chemokin, 2) w przeciwieństwie, komórki T o fenotypie CD4⁺BV8S2⁺, zawierające klonotypowe komórki T z transgenicznym TCR lub subpopulację limfocytów T z transgenicznym BV8S2 w połączeniu z nietransgenicznym α V, miały zdolność odpowiedzi na stymulację peptydem MBP-AC1-11 i produkcję zarówno IFN- γ jak i IL-10. 3) podwójnie negatywne CD4⁻CD8⁻ limfocyty T z BV8S2⁺ nie odpowiadały na stymulację MBP-Ac1-11 mimo pozornie klonotypowego TCR, produkowały małe ilości IFN- γ , ale nie IL-10 oraz posiadały wysoką ekspresję CCR2 i CCR1, co mogło ułatwiać im dostęp do OUN. Podsumowując, wyniki te sugerują, że regulatorowe komórki T mogą pochodzić zarówno z klonotypowych autoreaktywnych komórek jak i komórek o innych, endogennych swoistościach. Chociaż specyficzność TCR komórek regulatorowych w SP-EAE pozostaje w znacznym stopniu zagadką, to jednak wydaje się możliwym, że przynajmniej część aktywności skierowana jest przeciwko autoreaktywnym TCR determinantom z ekspresją łańcuchów BV8S2⁺/AV4⁺. Podobne przypadki indukcji komórek regulatorowych wykazano u szczurów Lewis¹²⁰, transgenicznych myszy BV8S2¹⁰⁷ i myszy typu dzikiego B10.PL^{121,122}.

W celu opracowania lepszych metod leczenia chorób autoimmunologicznych, w tym SM, konieczne jest lepsze zrozumienie mechanizmów immunosupresji przez regulatorowe komórki T. Ponieważ komórki regulatorowe wyrażają przeróżne i zmienne fenotypy, staje się coraz bardziej oczywistym, że lepiej charakteryzuje się je poprzez funkcję niż fenotyp. Już od jakiegoś czasu zainteresowanie komórkami regulatorowymi, które wpływają na przebieg wielu chorób autoimmunologicznych przeżywa swój renesans. Regulatorowe komórki Treg CD4⁺CD25⁺ T hamują wiele chorób autoimmunologicznych¹²³⁻¹²⁵, w tym EAE¹²⁶ oraz cukrzycę typu I u myszy i szczurów¹²⁷. W ostatnich latach, wykryto kilka nowych populacji regulatorowych komórek o wcześniej nieznanym fenotypach, w tym komórki znalezione w mysiej pochwie¹²⁸ i żeńskich narządach rodnych¹²⁹. Opisano też regulatorowe komórki T (CD4⁻/CD8⁻) posiadające zdolność eliminacji syngenicznych limfocytów T CD8⁺ przez bezpośredni kontakt komórek¹³⁰.

Wykryliśmy i opisaliśmy nową populację komórek regulatorowych, której wstępny fenotyp określiliśmy jako CD45^{dim}VLA-4^{+10,13}. Nasze badania nad ochronnym działaniem

różnorodnych pochodnych estrogenu wykazały, że są one zdolne do hamowania EAE i CIA (Collagen Induced Arthritis)^{2,3,7-13,74,75,98-100,131}. W każdym z tych badań obserwowaliśmy pojawienie się zarówno w śledzionie jak i OUN wcześniej nieopisaną populację komórek, którą również zidentyfikowaliśmy u ciężarnych myszy¹⁰. Wyizolowane komórki po podaniu myszom chroniły je przed SP-EAE i tłumiły antygenowo swoistą proliferację. Ocena fenotypu tych komórek była trudna, gdyż komórki te nie posiadają żadnych znanych markerów powierzchniowych typowych dla komórek immunokompetentnych i związanych z sygnalizacją poprzez TCR, natomiast wykazywały wyraźną ekspresję VLA-4. Większość limfocytów T rozwija się w grasicy i wykazuje dobrze określone zmiany fenotypowe związane z ich dojrzewaniem. Jednakże, istnieją różne populacje komórek T, które dojrzewają poza grasicą jak np. jelitowe, wewnątrzepitelialne limfocyty IEL (Intestinal Intraepithelial Lymphocytes)¹³². Komórki te zasiedlające jelito cienkie zawierają złożoną mieszaninę komórek T, która składa się zarówno z limfocytów $\alpha\beta$ jak i $\gamma\delta$. Można je odróżnić od zwykłych limfocytów T pochodzenia grasicznego tym, że posiadają niezwykle koreceptor tzw. CD8 α homodimer^{133,134} i dojrzewają w nabłonku przewodu pokarmowego^{135,136}. Niedojrzałe IEL mogą rearanżować geny dla TCR i ekspresjonować pre-TCR (pre-T α), marker świadczący o ich pokrewieństwie do komórek T. Pre-T α transkrypt jest ekspresjonowany przez niedojrzałe CD4⁺CD8⁻ tymocyty i jest nieobecny na TCR $\gamma\delta$ tymocytach czy komórkach NK śledziony¹³⁷. Interesujące jest to, że nasze komórki ekspresjonowały transkrypt dla CD8 α i TCR co sugeruje, że mogą reprezentować prekursorów komórek T $\alpha\beta$, które dojrzewają poza grasicą. Ich pozagrasiczne pochodzenie zostało dodatkowo potwierdzone u myszy bezgrasiczych takich jak MHC klasy II['] - i β 2-m['] - u których indukcja naszych komórek przebiegała na identycznym poziomie jak u myszy dzikiego typu. Wynik ten wskazuje na to, że komórki CD45^{dim}VLA-4⁺ nie wymagają MHC klasy I lub MHC klasy II dla swojego różnicowania. W tym kontekście ważne są nieklasyczne cząsteczki MHC, a w szczególności CD1, ważne w pozagrasiczym różnicowaniu się komórek T np. komórek NKT. Warto zauważyć, że nie byliśmy w stanie wygenerować CD45^{dim}VLA-4⁺ u myszy CD1^{-/-} z nieczynnym genem dla CD1. Pod tym względem CD45^{dim}VLA-4⁺ przypominają komórki NKT macierzyste w tym, że wymagają CD1 dla normalnego rozwoju. Co więcej, nasza hipoteza, że komórki CD45^{dim}VLA-4⁺ mogą być spokrewnione z linią NK była poparta wykryciem w naszych komórkach transkryptów kodujących CD16 i CD44, będących markerami komórek NK. Ponadto populacja CD45^{dim}VLA-4⁺ cechowała się wysokim poziomem transkryptu dla IL-13. IL-13 jest jedną z cytokin produkowanych przez limfocyty Th2 odgrywającą ważną rolę w hamowaniu EAE¹³⁸. Istnieją doniesienia, że znaczącym źródłem IL-13 są komórki NKT¹³⁹. Nieklasyczne komórki NKT zależne od CD1d zdolne były do produkcji IL-13 i inicjowania nietypowej odpowiedzi typu Th2 we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego¹⁴⁰. Potencjalne możliwości CD45^{dim}VLA-4⁺ do wytwarzania IL-13 mogą stanowić jeden z możliwych mechanizmów używanych przez te komórki w blokowaniu EAE. Co ciekawe, komórki CD45^{dim}VLA-4⁺ również charakteryzują się selektywną ekspresją transkryptu dla receptora CCR3, o którym wiadomo, że preferencyjnie ekspresjonowany jest przez komórki Th2¹⁴¹. Tak więc CD45^{dim}VLA-4⁺ wykazują pewne cechy wspólne z komórkami regulatorowymi typu Th2. Cechą charakterystyczną dla CD45^{dim}VLA-4⁺ była również silna ekspresja genu IP-15. Nasze wcześniejsze badania z wykorzystaniem techniki Affymetrix wykazały, że ekspresja tego genu była zwiększona dziesięciokrotnie w splenocytach izolowanych z myszy leczonych E2⁷. W innym laboratorium stwierdzono aktywację tego genu u myszy w czasie ciąży, a jego rola ma kluczowe znaczenie w regulacji białek zaangażowanych w zapoczątkowanie i utrzymanie ciąży¹⁴². Warto zauważyć, że w naszych poprzednich badaniach obserwowaliśmy spontaniczną indukcję CD45^{dim}VLA-4⁺ u ciężarnych myszy, zwłaszcza nasiloną w trzecim trymestrze¹⁰, co zwraca uwagę na ich potencjalną rolę w tolerancji immunologicznej w ciąży.

Ponadto nasze komórki cechowały się wysoka ekspresją transkryptu *bcl-xl*. *Bcl-xl* jest dobrze scharakteryzowanym członkiem genów antyapoptotycznych rodziny *bcl-2*. *Bcl-xl* hamuje apoptozę indukowaną przez *Bax/Bid* poprzez blokowanie uwalniania mitochondrialnego cytochromu C, które jest odpowiedzią na różne bodźce apoptotyczne¹⁴³⁻¹⁴⁶. Antyapoptotyczny gen *bcl-xl* odpowiedzialny jest za przeżywalność komórek linii erytroidalnej i limfocytarnej. Stwierdzono, że odgrywa istotną rolę w przeżywaniu komórek nerwowych OUN zarówno u osobników dorosłych jak i u zarodków^{147,148}. Nasze dalsze badania kinetyczne *in vivo* sugerują zależność intensywności produkcji $CD45^{dim}VLA-4$ od poziomu estrogenów w surowicy krwi. Powstaje ich najwięcej po 72 godzinach od zastosowania terapii estrogenowej i liczba ich zmniejsza się w miarę spadku stężenia estrogenów we krwi. Warto podkreślić, że komórki $CD45^{dim}VLA-4^+$ są nietrwałe w warunkach *in vitro*. Ze względu na to, że jeszcze nie potrafimy sprostać im wymaganiom hodowlanym w warunkach laboratoryjnych, dodatkowe manipulacje za pomocą testu ELISA i ELISPOT są obecnie niemożliwe. Intrygującym jest fakt, że $CD45^{dim}VLA-4^+$ można wyindukować poprzez wstrzyknięcie *Mycobacterium tuberculosis*. Dodanie E2 powodowało dalsze nasilenie ich produkcji. Pytaniem pozostaje czy komórki te mogą brać udział w ochronie przed infekcjami bakteryjnymi. Powszechnie wiadomo, że komórki NKT można wyindukować przez stymulację ekstraktami glikolipidów wyizolowanych ze ścian komórkowych *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴⁸. Nasze dane wskazują, że komórki $CD45^{dim}VLA-4^+$ przynajmniej w części posiadają cechy komórek NKT. Jest prawdopodobne, że stanowią one częściowo zróżnicowane lub nawet niezróżnicowane prekursorzy NKT. Jednakże, nie wyklucza się możliwości, że może to być heterogenna populacja, w skład której wchodzi między innymi komórki dendrytyczne i/lub ich prekursorzy, a nawet komórki macierzyste. Istnieje kilka istotnych podobieństw komórek $CD45^{dim}VLA-4^+$ z komórkami macierzystymi lub ich prekursorami. Po pierwsze, nasze komórki nie mają na swojej powierzchni żadnych markerów charakterystycznych dla linii komórek krwiotwórczych. Po drugie, wykazują właściwości immunosupresyjne tak jak np. mezenchymalne komórki macierzyste (MSC). Po trzecie charakteryzują się podwyższonym poziomem transkryptu dla *CD44* markera cechującego MSC, i wreszcie, że ekspresjonują na powierzchni *VLA-4* cząsteczkę adhezyjną, która odgrywa kluczową rolę w przemieszczaniu i inwazji MSC. Zatem hipotezą alternatywną jest to, że komórki $CD45^{dim}VLA-4^+$ stanowią populację regulatorowych komórek macierzystych, które modulują odpowiedź immunologiczną pod kontrolą hormonów płciowych. Lepsze zrozumienie pochodzenia, roli i funkcji komórek $CD45^{dim}VLA-4^+$ pojawiających się naturalnie w czasie ciąży może otworzyć nowe możliwości badań w immunologii i prowadzić do lepszego zrozumienia regulacji tolerancji immunologicznej.

1.6. Nowe geny jako cel terapii w SM

Ostatni szybki rozwój technik sekwencjonowania, jak również technologii mikromacierzy (np. Affimetrix) pozwalających na identyfikację nowych genów dostarczają skutecznych narzędzi do zrozumienia mechanizmu działania czynników potencjalnie przydatnych w leczeniu SM, w tym terapii hormonalnej. Techniki mikromacierzy DNA są bardzo obiecujące i stanowią skuteczne narzędzia do badania całościowego profilu transkrypcyjnego genów w różnych strategiach terapeutycznych¹⁴⁹. Technika ta może być wykorzystana do identyfikacji, ilościowej weryfikacji i interpretacji całościowego profilu genów w jednej próbce¹⁵⁰.

Nasze badania Affimetrix przeprowadzaliśmy na immunizowanych myszach w ostrej fazie EAE i immunizowanych myszach, które nie wykazywały objawów choroby w skutek leczenia E2³. Jednym z istotnych odkryć było to, że leczenie estrogenami miało ograniczony i wybiórczy wpływ na jedynie 10% badanych genów. Dla większości z tych genów bezpośredni związek z EAE i /lub terapią estrogenową jest zupełnie nieznan. Z genów

przebadanych w śledzeniu i biorących udział w odpowiedzi immunologicznej jedynie 18 odpowiedziało zmianą ekspresji na terapię estrogenową. E2 miało największy wpływ hamujący na ekspresję TNF- α (ponad 10-krotne zmniejszenie ekspresji). Ponadto wykryliśmy zahamowanie ekspresji Pgrp (członek nadrodziny TNF biorący udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej¹⁵¹), RANTES (kluczowa chemokina aktywowana w OUN odgrywająca zasadniczą rolę w patogenezie MS i EAE^{1,51,53}) oraz NCAM (znaleziona w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z aktywnym MS)^{152,153}. Obniżenie ekspresji tych cząsteczek może mieć związek z bezpośrednią pozytywną regulacją przez E2 transkryptów dla: CTLA-4 (główny inhibitor aktywacji limfocytów T¹⁵⁴), TGF- β 3 (cząsteczka o silnym działaniu przeciwzapalnym i aktywowana przez E2^{11,155}), GRP-1 (cząsteczka wiążąca fosfoinozytole biorące udział w przekazywaniu sygnału¹⁵⁶) oraz dyzintegrynowej metaloproteazy (znaleziona na dojrzałych komórkach dendrytycznych i prawdopodobnie regulująca produkcję TNF¹⁵⁷). Rola pozostałych genów w splenocytach, regulowanych przez E2, jest bardziej spekulacyjna. E2 pozytywnie regulowało IL-18^{35,158} i dwa indukowane przez IFN białka, takie jak: IP-15^{13,159} a także GARG-16¹⁶⁰, co sugeruje, że czynniki te mogą być związane z opisanymi wcześniej ochronnym wpływem IFN- γ na przebieg EAE. Ponadto, terapia E2 wpływała na podwyższenie ekspresji: MCP-1 (wykryta u myszy doustnie toleryzowanych przez encefalitogenne białka^{161,162}), MIP-1 α (pozytywnie regulowana w OUN w przebiegu EAE i MS^{52,53}), ale także w LN myszy chronionych przed EAE terapią z zastosowaniem TCR¹ i VCAM (główna cząsteczka uczestnicząca w przyleganiu leukocytów do śródbłonna naczyniowego^{163,164}), jak również MGF (wspomaga wzrost komórek tucznych zaangażowanych w proces patogenezy EAE¹⁶⁵) oraz CCR3 (receptor ekspresjonowany na komórkach Th2 i komórkach tucznych u myszy chronionych przez EAE terapią TCR i E2^{1,13,141,166}). Podwyższenie poziomu chemokin i cząsteczek adhezyjnych w śledzeniu może przyciągać i zatrzymywać komórki zapalne i hamować ich migrację do OUN. Trudno wyjaśnić podwyższenie poziomu ekspresji łańcucha lekkiego CD98, który jako heterodimer uczestniczy w aktywacji, proliferacji i adhezji komórkowej^{167,168} lub CD14 (receptor dla LPS na komórkach Kupffera wrażliwy na działanie E2¹⁶⁹). Podwyższenie produkcji MCP-1, TGF- β 3 i CCR3 i obniżenie produkcji TNF- α i RANTES potwierdziliśmy za pomocą techniki RPA (Ribonuclease Protection Assay). W SC, estrogen znacząco hamował ekspresję wielu genów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej⁷. Estrogen wywarł istotny wpływ na 315 genów, z których 302 było negatywnie a 13 pozytywnie regulowanych. Najsilniej, bo powyżej 20-krotnie regulowane były geny należące do antygenów zgodności tkankowej, cytokin, chemokin i ich receptorów, cząsteczek adhezyjnych oraz białek biorących udział w przekazywaniu sygnału. Hamujący wpływ na ekspresję genu dla receptora TCR β v8.2 i genów charakterystycznych dla makrofagów np. MAC-1 α -chain i F4/80 sugeruje, że głównym efektem estrogenów jest zahamowanie migracji zapalnych komórek jednojądrzastych do CUN.

W celu uzyskania bardziej przejrzystych wyników odnośnie genów potencjalnie zaangażowanych w proces patogenetyczny EAE, w kolejnych badaniach zastosowaliśmy mysi model RAG-1^{-/-} (T/R-) zdolny do spontanicznej indukcji (SP-EAE), czyli wywołany bez użycia CFA (Complete Freund Adjuvant) silnego adjuwanta stosowanego powszechnie do immunizacji. U myszy T/R-, EAE rozwija się równomiernie ze względu na brak generowania ochronnych endogennych komórek T¹¹⁵. Model ten jest uważany za dobrze przypominający klinicznie i histopatologicznie SM.

Nasze dane wykazują, że mniej niż 10% badanych genów zmieniło swoją ekspresję w OUN pod wpływem Sp-EAE w porównaniu z myszami zdrowymi. 96% z tych genów uległo silnej aktywacji. Należą do nich geny zaangażowane w prezentację antygeny i odgrywające znaczącą rolę w procesie chorobowym. Grupa tych genów była zdominowana przez dwa geny MHC klasy II: H2Aa (wzrost 424-krotny) i α H2E (258-krotny). Większość pozostałych

genów zaangażowanych w prezentację antygeny należało zarówno do MHC klasy II jak i MHC klasy I związanych z kompleksem H2, odpowiedzialnym za zwiększoną podatność na EAE¹⁷⁰. Silnie nasiloną ekspresją szerokiej gamy transkryptów dla MHC klasy II, w połączeniu z cząsteczkami kostymulującymi jak CD80 i CD86 (15,4 i 8,4 krotnie), wskazuje na zaangażowanie lokalnych, tkankowospecyficznych komórek prezentujących antygen, takich jak monocyty, komórki mikrogleju i komórki dendrytyczne, biorące udział w prezentacji MBP-AC1-11 peptydu dla napływających encefalitogennych komórek T (TCR BV8S2, 7,1 krotnie). Ciekawym odkryciem było podwyższenie ekspresji LMP7 (Large Multifunctional Protease 7, (26,7)), który bierze udział w przetwarzaniu peptydów prezentowanych przez MHC klasy I. Gen ten został zidentyfikowany jako marker w wielu chorobach autoimmunologicznych ogólnoustrojowych¹⁷¹ i ewentualnie może być przydatny do monitorowania procesu zapalnego u pacjentów z SM. Ponadto wykazaliśmy wzmożoną ekspresję dla genów kodujących czynniki transkrypcyjne jak STAT i IRF1 (15,2 i 10,3, odpowiednio) kontrolujące ekspresję MHC u pacjentów z SM⁹⁶. Silna aktywacja genów MHC klasy I i II, β -mikroglobuliny, składników dopełniacza C3 (C3; 11,4), które uważa się, że odgrywają kluczową rolę w degeneracji oligodendrocytów¹⁷², C1q (trzech podjednostek C1q, od 8,2 do 12,2), które przyczyniają się do rozwoju chorób neurologicznych w tym EAE¹⁷³ i amyloidu surowicy A3 (SAA, 126,5), bioaktywnego białka wytwarzanego podczas zapalenia i u pacjentów z SM w postaci zaostrzeń i remisji (RR - relapsing-remitting)^{174,175} wskazuje na silną aktywację układu odpornościowego w organie docelowym.

Pomimo silnego procesu zapalnego w OUN, wiele typowych prozapalnych cytokin, w tym IFN- γ i TNF- α nie wykryto u chorych zwierząt. Brak ekspresji tych klasycznych prozapalnych cytokin w OUN u myszy C57BL/6 z EAE odnotowali także Ibrahim i wsp.¹⁷⁶. Co ważne, wiele genów zidentyfikowanych przez Ibrahima zostało potwierdzonych w naszych badaniach. Nowe geny wykryte przez nas obejmują CD53 (10,9) (cząsteczka adhezyjna i kostymulująca), FC-gammaR1 (27,3) i IFR1 (10,3) (czynnik transkrypcyjny ważny w procesie różnicowania monocytów i makrofagów). Pomimo braku zmian w ekspresji genów dla IFN- γ i TNF- α , w naszych badaniach zmienionych było wiele genów, których ekspresja zależy od IFN- γ lub TNF- α . Na przykład, okazało się, że zmianie ekspresji podlegał MIG (173,7) (monokina indukowana przez interferon gamma), i IP-10 (49,5) (białko indukowane przez interferon), oba wytwarzane przez makrofagi i astrocyty w ciężkich demielinizacyjnych zmianach w SM¹⁷⁷; IL-18bp/IGIFbp (24,6) (białko wiążące interleukinę-18 indukowane przez IFN- γ) i inne cytokiny Th1¹⁷⁸; STAT1 (15,2) indukowany przez IFN- γ ; pięć GTPaz regulowanych interferonem: mGBP-2 (234,3) pochodzącą z makrofagów¹⁷⁹; TGTP (135,8), prawdopodobnie odgrywającą istotną rolę w rozwoju komórek T i/lub aktywacji limfocytów T¹⁸⁰; IRG-47 (120,9), aktywną w makrofagach¹⁸¹, białko IIGP (114,0) związane z utratą neuronów w zakażonej prionami tkance mózgowej w chorobie kłusowej¹⁸² i IGTP azy (33,4), aktywne w makrofagach¹⁸³ i inne geny biorące udział w przekazywaniu sygnału i regulacji transkrypcji. Wśród genów regulowanych przez TNF- α były: białko 2 indukowane TNF-em (5,0), znajdujące się na dojrzałych monocytach krwi obwodowej¹⁸⁴ oraz limfotoksyna α i β (9,1), które zostały zlokalizowane w astrocytach i oligodendrocytach u pacjentów z SM^{185,178}.

Demielinizacja jest główną cechą EAE i MS. Aktywacja katepsyn jest odzwierciedleniem degradacji białek mielinowych¹⁸⁶. W naszym badaniu, wykryliśmy aktywację kilku białek związanych ze stresem w tym cytochromów (od 7,8 do 21,1), dehydrogenazy ksantynowej (16,9) i ceruloplazminy (4,6), które u pacjentów z SM stanowią odpowiedź na zwiększony stres oksydacyjny¹⁸⁷. Co ciekawe, z czterech na pięć genów, których ekspresja była obniżona, należało do genów związanych z uszkodzeniem mielin, a także nieodpowiedniej jej odbudowy. Należą do nich: dekarboksylaza mewalonianu (MVD, 5,4) (enzym obecny w mózgu i bezpośrednio zaangażowany w regulację syntezy cholesterolu

i prawidłowej mielinizacji¹⁸⁸), syntaza lanosterolu (LSS, 4,6) (główny prekursor syntezy cholesterolu w mózgu i główny sterol osłonki mielinowej¹⁸⁹), oraz IC (inhibitor kinazy zależnej od cyklin (P57, 4,9)) i gen beta-1-globiny (4,6) (zapewniający morfologiczną i funkcjonalną neuroprotekcję¹⁹⁰).

Wykrycie podwyższonej ekspresji genów OUN, które mogą mieć potencjalne znaczenie dla patomorfologii EAE jest istotne. Do grupy tych genów należą następujące cząsteczki: IRG-1 (15,6) (gen zaangażowany w immunosupresję; marker regulowany przez IFN- γ podczas wczesnej aktywacji mikrogleju¹⁹¹), endobrewina (VAMP8, 5,8) (synaptyczne białko o strukturze podobnej do VAMP2, które zostało znalezione u pacjentów z SM¹⁹²), kallikreina8/synapsyna (KLK8, 5,5) (ważna dla plastyczności neuronalnej i odkryta w chorobie Alzheimera¹⁹³) i aneksyna IV (obecna w reaktywnych astrocytach i oligodendrocytach w mózgu człowieka¹⁹⁴). Na wymienienie zasługują również następujące geny: FcgammaRI (27,3) (myszy z mutacją celowaną tego receptora, były chronione przed EAE¹⁹⁵), ICAM-1 (12,9) i CD11a (6,4) (przeciwciała przeciwko CD11a i ICAM-1 hamują EAE u szczurów¹⁹⁶); CD68 (7,1) (microsialina) (wykryta u pacjentów z SM i mogąca przyczynić się do tworzenia komórek piankowatych w zmianach miażdżycowych¹⁹⁷) i kaspaza-11 (4,9) (grająca istotną rolę w patogenezie i śmierci oligodendrocytów w EAE¹⁹⁸).

Niektóre nasze wyniki pokrywają się z wcześniej opublikowanymi danymi przez Locka i wsp., którzy badali profile ekspresji genów w próbkach pobranych od pacjentów z SM¹⁹². Jednak niektóre z tych genów w naszej pracy nie są wymienione, ponieważ nie przeszły ustalonej znamiennej wartości progowej i nie miały znaczącej wartości p. Na przykład, w naszych badaniach zmiana ekspresji genu dla CD59 zaangażowanego w hamowanie tworzenia się kompleksów błonowych podczas ataku dopełniacza i biorącego udział w funkcji komórek T i NK¹⁹⁹ osiągnęła jedynie 1,9-krotność, a osteopontyna, gen wczesnej aktywacji komórek T²⁰⁰ podwyższony był jedynie 1,2-krotnie. Podsumowując, nasze badania Affimetrix wykazały, że: (1) profile ekspresji genów znalezione w SC u chorych myszy T/R- i T/R + były podobne, choć zmiany w ekspresji genów były bardziej nasilone u T/R + myszy co jest najprawdopodobniej efektem zastosowania adiuwantu CFA, (2) podwyższenie ekspresji genu dla receptora TCR BV8S2 (7,1) i genów charakterystycznych dla makrofagów (np. MAC-1 α łańcuch (13,9); MAC-2 (29,7) i lizozymy: LZP-S (526,0) i Lys-M (88,2)) sugerują, że zarówno komórki T jak i makrofagi to dwa główne źródła komórek zapalnych jednojądrzastych w narządzie docelowym, (3) większość genów ze wzmożoną ekspresją to geny zależne od regulacji przez TNF- α /IFN- γ co sugeruje, że odgrywają one pierwszoplanową rolę w patogenezie choroby, (4) choć rola większości wykrytych genów nie jest jeszcze poznana, potencjalnie mogą one przyczyniać się do wrażliwości na EAE a także SM; (5) wiele odkrytych genów miało związek z innymi procesami jak apoptoza czy przekazywanie sygnału. Badania te pozwoliły na scharakteryzowanie szrokiego panelu wcześniej nieznanych genów w EAE i terapii hormonalnej, a także nowych szlaków i procesów mogących mieć istotne znaczenie dla patogenezy chorób autoimmunologicznych.

1.7. Zastosowanie terapii hormonalnej w leczeniu SM – badania kliniczne

Nasze badania nad mechanizmami prowadzących do rozwoju jak i regulacji EAE, a także ochronnej roli hormonów w chorobach autoimmunologicznych i interakcji pomiędzy układem odpornościowym i hormonalnym, stworzyły solidne podwaliny do opracowania nowych metod leczenia SM. Dalsze badania mechanizmów na poziomie komórkowym i genowym wpływu estrogenów i testosteronu w chorobach autoimmunologicznych są w trakcie intensywnej fazy. Jednym z pierwszych doniesień o receptorze estrogenowym α (ER- α) i jego znaczenia w regulacyjnych właściwościach estrogenów pochodzi z naszego

laboratorium¹³¹. ER- α okazał się być istotny dla immunoregulacyjnych i neuroprotektoryjnych właściwości estrogenu w różnych modelach EAE²⁰¹⁻²⁰⁵. Leczenie z zastosowaniem ligandów dla ER- α znacznie obniżało zachorowalność na EAE^{203,204} poprzez obniżanie ekspresji cytokin Th1, takich jak TNF- α , IFN- γ i IL-5^{201,203,205}, MMP-9²⁰², a także procesu zahamowania utraty aksonów i demielinizacji^{201,203,205}. Leczenie to zapobiegało niedoborom w funkcji synaptycznej i neuropatologii hipokampa²⁰⁶, a także zanikowi szarej materii w mózgdzku²⁰⁷. Nie można było jednak udowodnić wpływu działania ligandów bezpośrednio na redukcję neurodegeneracji bez czynnika zapalnego. W przeciwieństwie do tego, bezpośrednie działanie ochronne na komórki OUN takie jak neurony, astrocyty i oligodendrocyty udowodniono dla drugiego receptora jądrowego estrogenów-ER β . Leczenie ligandami ER- β skutkowało zachowaniem mieliny i ochroną aksonów bez kształtowania odpowiedzi immunologicznej²⁰⁵. Leczenie ligandami ER- β jest bardzo obiecujące, ponieważ pozbawione jest efektów ubocznych estrogenów, głównie będące skutkiem przekazywania sygnału przez ER- α . Innymi obiecującymi strategiami leczenia SM jest użycie selektywnych modulatorów ER (SERM). Działają one bez hormonalnych niekorzystnych efektów ubocznych w roli agonisty lub antagonisty, w zależności od tkanki. Dwa klinicznie istotne SERM: tamoksyfen i raloksyfen były w stanie hamować czynną i bierną formę EAE, jednak z mniejszym skutkiem, w porównaniu do E2^{201,208}. Poza wyżej wymienionymi jądrowymi ER, estrogen może wiązać GPR30, receptor błony komórkowej sprzężony z białkiem G. Leczenie G-1, selektywnym agonistą GPR30 wykazującym brak estrogenowych skutków ubocznych, przyniosło równie dobre efekty jak leczenie E2 poprzez obniżenie ekspresji cytokin i zwiększoną aktywność komórek Treg na drodze zależnej od PD-1 (Programmed Death-1)²⁰⁹⁻²¹². Receptory dla estrogenu obecne są na wielu różnych rodzajach komórek układu krwiotwórczego, a także innego pochodzenia i aktualny kierunek badań nastawiony jest na identyfikację tych komórek, a także na poznanie molekularnych interakcji będących skutkiem interwencji hormonalnej. Wstępne badania wskazują, że głównym celem estrogenów są komórki T, jednak badania z zablokowanym genem dla ER- α i chimerami szpiku kostnego wykazują, że ani komórki T ani B nie są głównym celem hormonów²¹³. Niemniej limfocyty T i poziom ekspresji ER- α na tych jak i innych komórkach immunologicznych mogą stanowić bezpośredni cel terapii hormonalnej w zależności od warunków eksperymentalnych i zastosowanej strategii leczenia^{214,215}. W badaniach z zastosowaniem myszy z unieczynnionym genem dla ER- α wykazano, że limfocyty B wyizolowane z tych myszy były niezdolne do immunoregulacji limfocytów T i w związku z tym wykazują kluczową rolę w hormonalnej terapii EAE²¹². Nasze badania sugerują, że estrogen reguluje odpowiedź komórek T przez bezpośrednie oddziaływanie z DC¹⁰⁰. Najnowsze dane wykazały, że DC pochodzenia mieloidalnego są niezbędne w regulatorowej funkcji estrogenów²¹⁶. Oczekiwane są dalsze badania, aby dogłębnie poznać wpływ estrogenów na komórki układu immunologicznego. ER- α ekspresjonowany jest również przez różne rodzaje komórek w OUN i okazało się, że np. astrocyty były odpowiedzialne za neuroprotektoryjne działanie estrogenu^{204,217}. Najnowsze badania pokazują, że estrogen hamuje transkrypcję NF- κ B w reaktywnych astrocytach i zmniejsza ekspresję CCL2 stymulowaną TNF- α ²¹⁸.

Pierwsze kliniczne dowody korzystnego wpływu testosteronu i estriolu u SM pacjentów pochodzą z dwóch zakończonych badań pilotażowych. W badaniu z testosteronem, mężczyźni leczono 100 mg dawką hormonu przez 12 miesięcy²¹⁹. Leczenie prowadziło do poprawy funkcji poznawczych, redukcji atrofii mózgu i zmniejszenia nadwrażliwości typu późniejszego, zmniejszenia ilości komórek T CD4⁺ oraz zwiększenia ilości komórek NK^{219,220}. W badaniach z estriolem (dawka 8mg) trwających 22 miesiące, leczeniu poddano sześć kobiet z RRMS (nawracająco-postępująca postać SM) oraz cztery SPMS (wtórnie postępująca)²²¹. Pozytywne efekty leczenia wyraźne były w grupie z RRMS co objawiało się zmniejszoną reakcją DTH i polepszeniem funkcji poznawczych. Badania immunologiczne wykazały, zmniejszone ilości

komórek CD4⁺, CD8⁺, wzrost naiwnych limfocytów T a także CD19⁺ komórek B²²². Dalsze próby kliniczne z zastosowaniem estriolu trwają.

Obecne strategie leczenia SM skupiają się głównie na aspekcie odpowiedzi immunologicznej choroby. Jednakże powszechnie stosowane leki przeciwzapalne nie są wystarczająco skuteczne. W patologii SM, stan zapalny uważany jest za pierwotny w stosunku do neurodegeneracji OUN²²³, która po zainicjowaniu może przebiegać bez reakcji immunologicznych. Istnieje znaczne zainteresowanie w rozwijaniu nowych metod leczenia, które będą ukierunkowane zarówno na aspekt zapalny jak i neurodegeneracyjny. Leczenie skojarzone z użyciem przeciwzapalnego IFN-β i środka neuroprotektynowego - liganda ER-α znacznie spowolniło EAE, zachowało gęstość aksonów i zmniejszyło stan zapalny w OUN²²⁴. Niektóre wnioski z tego badania były zupełnie niespodziewane. Wyniku nie można było przewidzieć na podstawie właściwości leczniczych każdego z czynników leczniczych osobno. Sugeruje to ważne implikacje kliniczne terapii skojarzonych i podkreśla złożoność potencjalnych interakcji leków. Aktualne badania kliniczne terapii skojarzonych z zastosowaniem hormonów, są obecnie prowadzone w Unii Europejskiej (Rebif-IFN-1 α/estriol) oraz w USA (Copaxone/estriol)

(www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00451204?term=multiple+sclerosis+estriol&rank=1)

VI. Inne osiągnięcia naukowe

Moje zainteresowania naukowe w obrębie chorób autoimmunologicznych oprócz stwardnienia rozsianego obejmują również toczenia rumieniowatego układowego. Na University of Maryland zaangażowana byłam w dwa duże projekty na temat toczenia, które opisane są poniżej.

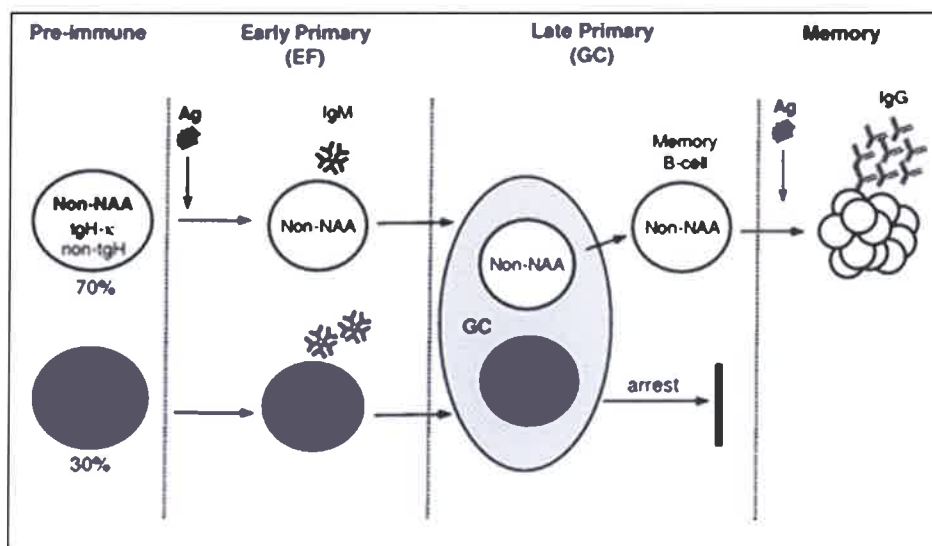
1. Toczeń rumieniowaty układowy (SLE -systemic lupus erythematosus) - rola naturalnych autoprzeciwciał (NAA- Natural Autoantibodies)

1.1. Udział limfocytów B produkujących NAA w patologii toczenia

Autoprzeciwciała, zwłaszcza te skierowane przeciwko antygenom jądrowym, są charakterystyczne dla SLE w populacji ludzkiej i jego mysiego modelu MRL-lpr (MRL/MpJ-Faslpr)^{225,226}. Przeciwciała te mają zdolność tworzenia kompleksów immunologicznych w narządach docelowych, zwłaszcza nerkach, odgrywając kluczową rolę w patogenezie SLE i wykorzystywane są w diagnostyce toczenia²²⁷⁻²³¹. Limfocyty B wytwarzające autoprzeciwciała zdolne do wywołania autoagresji podlegają rygorystycznej selekcji negatywnej, eliminacji na drodze apoptozy, anergii lub raanżacji autoreaktywnego receptora BCR²³²⁻²³⁸. W latach osiemdziesiątych, pojawiło się kilka doniesień o powszechności występowania autoreaktywnych i polireaktywnych przeciwciał w surowicy zdrowych ludzi i gryzoni, a także u niższych gatunków filogenetycznych²³⁹⁻²⁴³. Uważa się, że powstają one w sposób naturalny, bez stymulacji antygenowej i są obecne w krwi pępowinowej²⁴⁴ ludzkich²⁴⁵ i mysich²⁴⁶ noworodków, a także u myszy hodowanych w warunkach sterylnych i karmionych dietą bezglutenową²⁴⁷. Dlatego określane są mianem naturalnych autoprzeciwciał (NAA). Przynależą głównie do klasy IgM i są kodowane przez geny VH/VL^{248,249}. Badania w ciągu ostatnich 20-30 lat wykazały, że NAA zapewniają ochronę przed patogenami w bardzo wczesnym okresie życia²⁵⁰⁻²⁵², a także odgrywają rolę w autotolerancji ułatwiając usuwanie ciał apoptotycznych i różnorodnych autoantygenów²⁵³.

Nie jest wyjaśnione, czy komórki B produkujące NAA są w stanie aktywnie uczestniczyć w odpowiedzi immunologicznej na obce antygeny a w szczególności w odpowiedzi wtórnej zależnej od komórek T, i czy ich polireaktywności i autoreaktywność

może prowadzić do chorób autoimmunologicznych takich jak SLE. W celu zbadania roli NAA w procesie tworzenia się autoreaktywnych przeciwciał stworzyliśmy mysz transgeniczną sd-tg (side-directed-tg) PPC1-5H/NAA, u której gen łańcucha H z prototypowego NAA został dokładnie wstawiony w miejsce dla IgH²⁵⁴. Aranżacja łańcucha ciężkiego H (PPC1-5) z łańcuchem lekkim $\alpha 1$ tworzy przeciwciało NAA. W naszym modelu przeciwciała NAA wiążą DNA, aktywę, fosfocholinę, a także inne własne i obce antygeny²⁴⁸ a autoreaktywne komórki B ekspresjonujące ppc1-5H/NAA nie są eliminowane, ale pozytywnie selekcjonowane²⁵⁴. W tym kontekście są podobne do komórek B-1. Wykazują jednak wiele cech odmiennych od B-1. Komórki PPC1-5 znajdują się przeważnie w guzłach limfatycznych śledziony i węzłach chłonnych, a także w krążącej krwi obwodowej, i wykazują fenotyp, który różni się od typowych B-1 lub typowych komórek B w guzłach limfatycznych. Niezależnie od ich pochodzenia komórki limfocyty B PPC1-5H/NAA są aktywne w odpowiedzi na stymulację BCR i LPS. Przedmiotem naszych badań było wykazanie czy mogą one stanowić prekursorów dla autoreaktywnych komórek B, innymi słowy czy biorą udział w klasycznej odpowiedzi immunologicznej zależnej od komórek T (TD) np. w odpowiedzi na PC-KLH (Phosphorylcholine Conjugated Keyhole Limpet Hemocyanin)²⁵⁵. Nasze transgeniczne myszy stanowią szczególnie użyteczny model do tego celu, gdyż transgen jest wprowadzony ten sposób, że komórki B NAA mogą ulegać hipermutacji somatycznej i rekombinacji co jest cechą odpowiedzi TD. Z naszych badań wynika, że limfocyty B ppc1-5H/ $\lambda 1$ NAA mogą uczestniczyć we wczesnej reakcji na PC-KLH wytwarzaniem znacznych ilości IgM natomiast nie są zdolne do wytwarzania przeciwciał IgG. Próba wytworzenia hybrydom produkujących IgG nie powiodła się. Większość uzyskanych klonów komórek B o fenotypie IgG $\lambda 1$ cechowało się wymianą łańcucha PPC1-5VH na endogenny VH. Podsumowując, możemy stwierdzić, że komórki B ppc1-5H/ $\lambda 1$ NAA nie są w stanie przejść klasycznej drogi odpowiedzi immunologicznej na aktywację antygenem i wytworzyć swoiste dla antygeny przeciwciała IgG (Rys. 1).



Rysunek 1. Los limfocytów B NAA w klasycznej drodze aktywacji limfocytów B zależnej od komórek T.

Można stwierdzić, że naturalne autoprzeciwciała nie są "ignorowane" przez mechanizmy tolerogenne, ale raczej kontrolowane w czasie odpowiedzi immunologicznej w celu zapobiegania rozwojowi IgG o wysokim powinowactwie do autoantygenów. Podobną regulację obserwowano u ludzi z naturalnymi autoreaktywnymi limfocytami B VH4-34

wytwarzającymi przeciwciała przeciw zimnej aglutyninie²⁵⁶. U ludzi zdrowych były one pozytywnie selekcjonowane, ale podczas odpowiedzi immunologicznej eliminowane z puli limfocytów B i plazmocytów pamięci. U pacjentów z SLE i reumatoidalnym zapaleniem stawów autoreaktywne i polyreaktywne komórki B są wszechobecne. Istnieje prawdopodobieństwo, że u pacjentów tych komórki B NAA mogą być prekursorami patologicznych przeciwciał o izotypie IgG, co wskazywałoby na defekt kontroli komórek B NAA^{257,258}.

1.2. Rola limfocytów B produkujących NAA w immunoregulacji

Pozostaje sprawą kontrowersyjną czy NAA przyczyniają się do patologii chorób autoimmunologicznych, czy być może uczestniczą w ich regulacji. Ostatnie badania wskazują na rolę naturalnych IgM w utrzymaniu tolerancji. Myszy pozbawione wydzielniczych IgM, ale mające prawidłową liczbę komórek B i IgG, z łatwością rozwijają chorobę autoimmunologiczną przypominającą SLE^{259,260}. Natomiast myszy MRL-lpr, które są mysim modelem dla SLE (spontanicznie rozwijają chorobę) i u których dodatkowo zablokowano produkcję IgG, posiadały zwiększoną ilość IgM i nie były w stanie rozwinąć zapalenia nerek charakterystycznego dla tocznia²⁶¹. Istnieją również doniesienia, że podawanie przeciwciał IgM ma korzystny wpływ w niektórych modelach doświadczalnych chorób autoimmunologicznych^{262,263}. Analizując próbki surowicy od pacjentów z SLE, Mohan i wsp. stwierdzili, że obecność polireaktywnych przeciwciał IgM koreluje z łagodniejszym przebiegiem choroby²⁶⁴. Podobnie, Witte i wsp. odkryli odwrotną korelację między poziomem IgM przeciw dsDNA a nasileniem choroby nerek²⁶⁵. Dostępne informacje wskazują na złożoną funkcję naturalnych przeciwciał poli i autoreaktywnych w chorobach autoimmunizacyjnych. Prawdopodobnie z jednej strony mogą one w sprzyjających warunkach promować reakcje autoimmunologiczne, służąc jako matryce do tworzenia patologicznych autoprzeciwciał, a z drugiej strony mogą one zasadniczo hamować te procesy. Podjęliśmy próbę przetestowania tej drugiej hipotezy. Stworzyliśmy mysz transgeniczną PPC1-5H/MRL-lpr, która produkuje komórki B NAA zgodnie z prototypem i ma podłoże autoimmunologiczne (MRL-lpr). Nasze badania wykazują, że myszy transgeniczne cechowały się dłuższym przeżyciem i prawie całkowitym zahamowaniem proteinurii (białkomocz) i patologii nerek ze znacznie zmniejszoną ilością kompleksów immunologicznych w porównaniu do myszy kontrolnych (MRL-lpr)²⁶⁶. Ponadto wstrzyknięcie oczyszczonych przeciwciał PPC1-5 myszom MRL-lpr opóźniło wystąpienie białkomoczu. Myszy MRL-lpr i PPC1-5H/MRL-lpr miały bardzo różne profile podklas IgG; myszy dzikiego typu charakteryzowały się wysokim mianem IgG2a i IgG3 wykrywanych w wysoce zjadliwej formie zapalenia nerek, myszy transgeniczne miały przewagę najmniej chorobotwórczej podklasy IgG1. Ponadto myszy PPC1-5H/MRL-lpr miały obniżony poziom przeciwciał, w tym przeciwciał przeciw-dsDNA, przeciw-ANA i przeciw-Sm/RNP. W śledzeniu liczba limfocytów nie uległa zmianie, natomiast limfocyty CD4⁺ odznaczały się zmniejszoną ekspresją CD69 i zwiększoną ekspresją CTLA-4, co wskazuje na zahamowanie aktywacji limfocytów T. Ponadto, u myszy tych wzrosła liczba komórek CD4⁺IL-10⁺, co może wskazywać na indukcję komórek regulatorowych typu 1 (Tr1). Co ważne, komórki B PPC1-5 pod wpływem stymulacji CpG i LPS wytwarzały więcej IL-10 niż komórki B dzikiego typu. Podsumowując, nasze wyniki wskazują, że NAA odgrywają ważną rolę w ochronie przed mysim modelem tocznia, oraz sugerują, że NAA i/lub komórki B produkujące NAA mogą mieć wpływ na funkcję komórek T CD4⁺. Istnieje kilka potencjalnych mechanizmów ich ochronnego działania na choroby autoimmunologiczne. Po pierwsze, wydzielane IgM NAA mogą tłumić układowe zapalenie nerek, prawdopodobnie poprzez wspieranie usuwania komórek apoptotycznych i własnych antygenów. Po drugie, komórki B NAA mogą działać jako tolerogenne APC i w ten sposób inicjować ekspresję cząsteczki

CTLA-4 na komórkach T. Po trzecie, komórki B NAA po aktywacji przez ligandy dla TLR mogą różnicować się do regulatorowych komórek B produkujących IL-10 zdolnych do wywołania indukcji regulatorowych komórek Tr1 i w ten sposób przywracać równowagę Th1/Th2.

2. Immunologia nowotworów

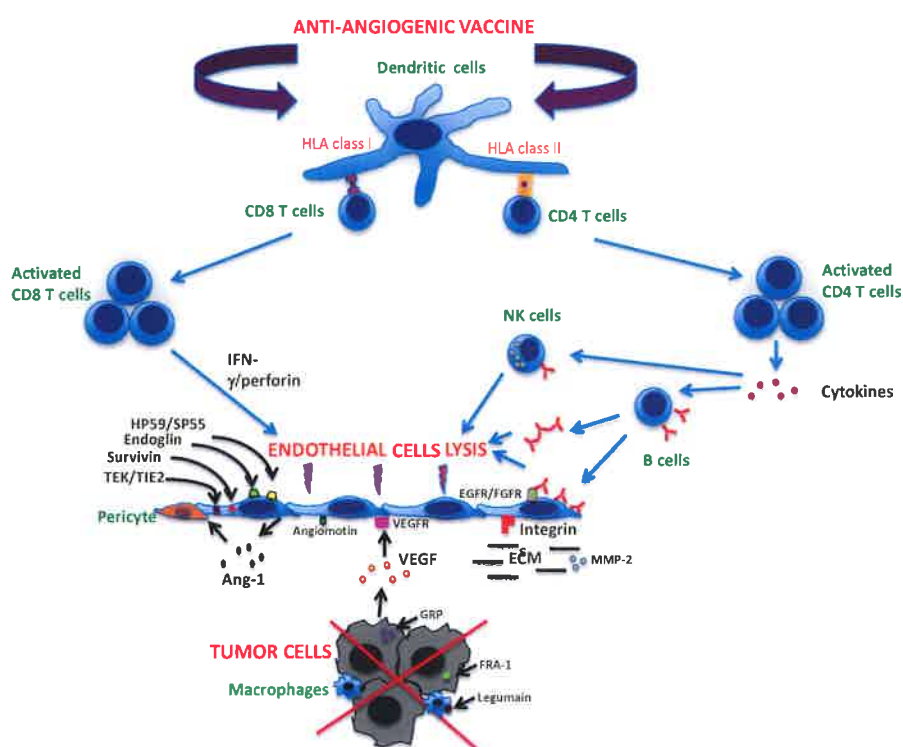
Sprawując rolę konsultanta naukowego miałam okazję napisać trzy obszernie prace przeglądowe, z których dwie obejmują dobrze mi znany temat nowotworów a zwłaszcza ich immunologii. Moja praca doktorska była poświęcona właśnie tej dziedzinie. W pracy doktorskiej zatytułowanej „Udział lektyn endogennych w oddziaływaniach adhezyjnych komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna naczyniowego” poruszałam temat glikozylacji towarzyszącej złośliwej transformacji raka, jak również rolę lektyn endogennych i cząsteczek adhezyjnych w interakcji komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna naczyniowego. Unikatowe modele badawcze, uzyskane w naszym laboratorium w tym czasie, składają się z nowych linii komórkowych zarówno raka jak i śródbłonna naczyniowego. Zidentyfikowane zostały konkretne cząsteczki adhezyjne, które odgrywają szczególnie ważną rolę w przypadku przerzutów i progresji nowotworu²⁶⁷⁻²⁷⁰. Opracowaliśmy komórkowe modele i systemy, które mogą służyć do: 1. badania mechanizmów przerzutów poprzez identyfikację cząsteczek odpowiedzialnych za lokalizację przerzutu; 2. badania roli angiogenezy w rozwoju nowotworu, 3. opracowania nowych leków przeciwnowotworowych, które są specyficzne dla danych tkanek. Wiele technik niezbędnych do badań procesu nowotworowego poznałam jeszcze przed pracą dokorską podczas mojego stażu w dwóch prestiżowych ośrodkach badań nad rakiem, a mianowicie: Holenderskim Instytucie Rakowym (The Netherlands Cancer Institute), Wydział Biologii Nowotworów, grupa prof. Ir. J. Hilkena oraz Wolnym Uniwersytecie (Vrije Universiteit), Wydział Medycznej Onkologii w Amsterdamie, grupa prof. G. J. Petersa.

Tak więc moje zainteresowania naukowe jako immunologa dotyczą zarówno chorób autoimmunologicznych jak i nowotworów. Przedstawiam bardzo krótkie wprowadzenia/streszczenia moich trzech przeglądówek z dziedziny nowotworów:

2.1. Szczepionki celujące w neowaskularyzację nowotworów²⁷¹

Jedną z najbardziej niebezpiecznych cech komórek nowotworowych jest ich zdolność do przerzutowania do odległych narządów, gdzie tworzą nowe naczynia krwionośne w procesie angiogenezy, namnażają się i kształtują nowe guzy. Angiogeneza indukowana jest przez niedotlenienie (hipoksja), hipoglikemię, uszkodzenia mechaniczne oraz zmiany genetyczne i zapalne²⁷², które prowadzą do aktywacji czynników wzrostowych i czynników proangiogennych^{273,274}. Rygorystyczna regulacja angiogenezy w zdrowych tkankach jest często zaburzona w guzie, prowadząc do wytworzenia patologicznych, nieszczelnych i niefunkcjonalnych naczyń krwionośnych co w efekcie prowadzi do zaburzonego transportu chemioterapeutyków. Leki przeciwingiogenne są już od kilku lat w użyciu klinicznym. Najczęściej stosowane są terapie oparte na przeciwciałach monoklonalnych skierowanych przeciw kluczowym mediatorom angiogenezy: VEGF i jego receptorowi VEGFR2. Mimo początkowo wielkich nadziei pokładanych w tych terapiach po latach okazało się, że efekt jest tylko przejściowy lub wręcz niepożądany²⁷⁵. Obecnie duże zainteresowanie skupia się głównie wokół szczepionek, przeciwciał wiążących białka ekspresjonowane przez śródbłonek naczyń nowotworowych. Szczepionki skierowane przeciw unaczynieniu guza mają przewagę nad szczepionkami skierowanymi przeciw nowotworom. Po pierwsze, nowotworowe komórki śródbłonna są bardziej dostępne dla komórek układu immunologicznego niż często odległe od

naczyń krwionośnych komórki guza. Po drugie, komórki śródbłonka są bardziej trwałe genetycznie niż komórki nowotworowe, co zmniejsza ryzyko wytworzenia oporności na immunoterapię^{276,277}. Po trzecie, obniżenie ekspresji MHC klasy I w komórkach śródbłonka jest mniej prawdopodobne, niż w komórkach nowotworowych co wiąże się z bardziej skuteczną odpowiedzią limfocytów CD8⁺. Po czwarte, blokowanie jednej komórki śródbłonka może mieć hamujący efekt na ok. 100 komórek nowotworowych²⁷⁸. W mojej pracy przeglądowej skupiam się na szczepionkach, które mają istotny czynnik przeciwingienny i potencjalnie są w stanie przełamać tolerancję immunologiczną na własne antygeny i wytworzyć silną i utrzymującą się odpowiedź immunologiczną prowadzącą do zwalczania raka. W złożony mechanizm działania szczepionek zaangażowana jest cała plejada immunologicznie kompetentnych komórek takich jak: limfocyty B, cytotoksyczne limfocyty T CD8⁺, limfocyty pomocnicze T CD4⁺, komórki dendrytyczne i komórki NK, z także mediatory reakcji immunologicznych jak cytokiny, chemokiny i ich receptory (Rys. 2).

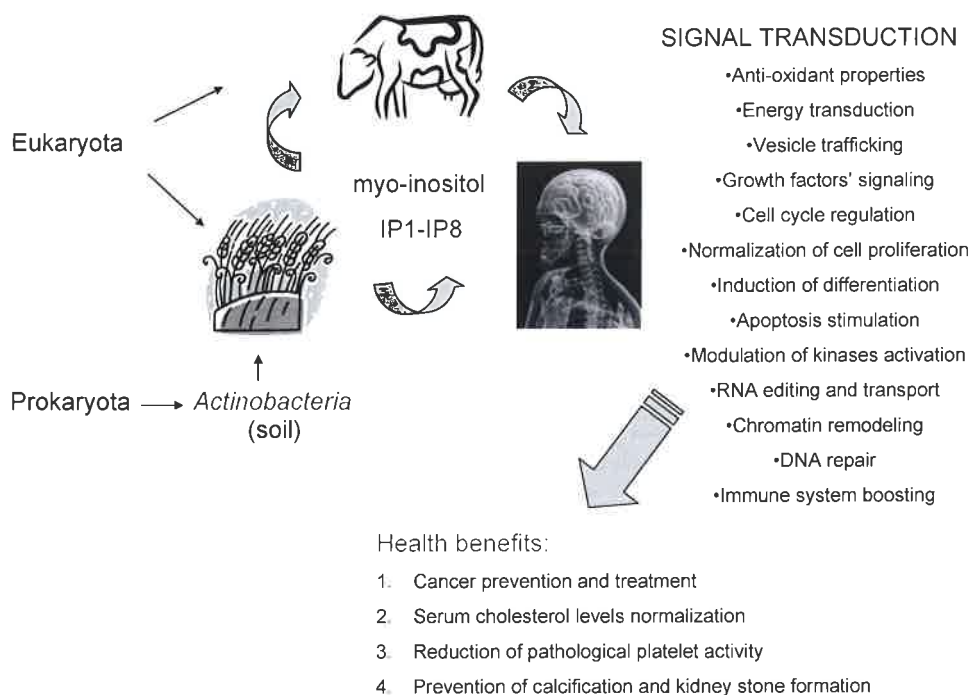


Rysunek 2. Odpowiedź immunologiczna indukowana szczepionkami przeciwingiennymi. Antygen wprowadzony przez szczepionkę podlega endocytozie przez komórki prezentujące antygen i prezentacji limfocytom. W zależności od rodzaju antygeny, drogi podania i wektora pobudzane są różne komponenty układu immunologicznego. Wyszczególnione są białka obecne na śródbłonku w środowisku nowotworowym i będące celem przeciwnowotworowych szczepionek.

2.2. IP6 w terapii przeciwrakowej: przeszłość, terażniejszość i przyszłość²⁷⁹

Aby przetrwać i wypełnić swoje wyspecjalizowane funkcje wszystkie komórki muszą skutecznie komunikować się ze swoim środowiskiem. Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa zachodząca za pomocą cząsteczek sygnałowych (m.in. cząsteczki sygnałowe II rzędu) jest złożonym mechanizmem używanym przez komórki do przekazywania informacji ze środowiska zewnętrznego i koordynacji homeostazy. Rodzina inozytoli reprezentuje filogenetycznie wszechobecną grupę sygnałową zdolną do wyjątkowo dynamicznej

sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Polifosforany inozytoli są cyklicznymi metabolitami glukozy. Obecność sześciowęglowego pierścienia tworzy bazę dla wielu miejsc fosforylacji, co prowadzi do różnych konstelacjach mono- i poli-fosforanów, w tym piro-fosforanowych pochodnych²⁸⁰. Najobficiej występującym polifosforanem inozytoli jest powszechnie występujący w przyrodzie heksafosforan inozytoli (IP6, InsP6 lub kwas fitynowy)²⁸¹. Początkowo zidentyfikowano go jako bogate źródło fosforu w roślinach^{282,283}. Później okazało się, że jest on również najbardziej wszechobecnym fosforanem inozytoli w komórkach eukariotycznych. U ssaków IP6 utrzymuje homeostazę, jest „magazynem” fosforanów i działa jako silny przeciwutleniacz i neuroprzebiegacz. Zdolności IP6 do szybkiego metabolizmu fosforanów uzasadnia jego kluczową rolę w mediacji wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału, kontroli proliferacji i różnicowania komórek, eksporcie RNA, naprawie DNA, przekazywania energii i regeneracji ATP. Korzyści zdrowotne łączone z IP6 to obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy, normalizacja aktywności płytek krwi, zapobieganie zwapnieniom i tworzenia kamieni nerkowych. IP6 uczestniczy również w prewencji raka. A głównie dlatego, że wykazuje silne właściwości przeciwutleniające i wzmacniające odporność. Rysunek 3 przedstawia występowanie, uczestnictwo w głównych szlakach przekazywania sygnału i potencjalne terapeutyczne właściwości IP6.

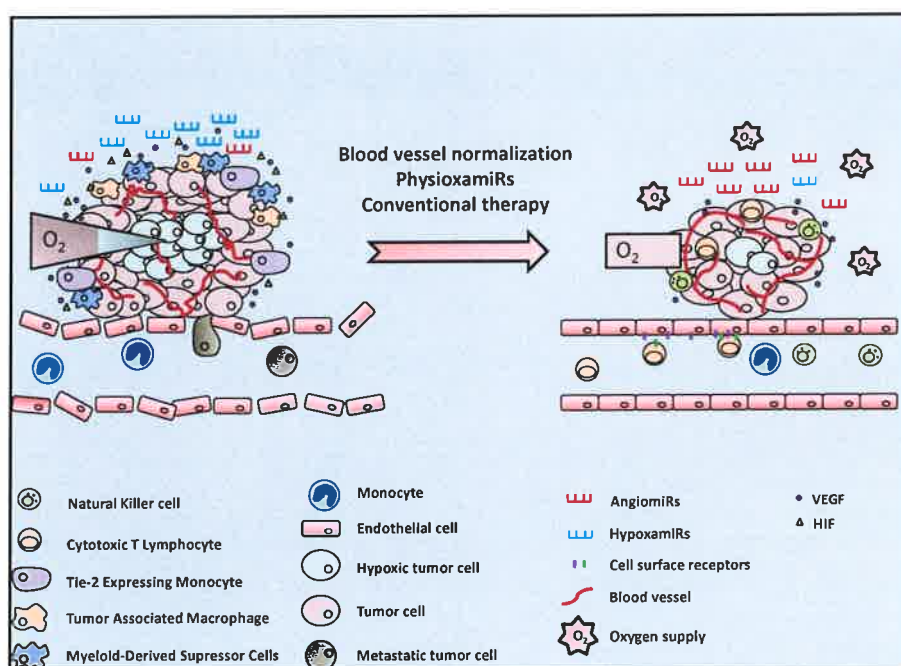


Rysunek 3. Występowanie, udział w szlakach przekazywania sygnału i potencjalne możliwości terapeutyczne inozytoli.

2.3. MiR i normalizacja unaczynienia guza: wpływ na przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną²⁸⁴

Nieskuteczna odpowiedź immunologiczna jest jedną z cech toczącego się procesu nowotworowego. Chaotyczne i nieszczelne naczynia krwionośne powstające w procesie angiogenezy ułatwiają komórkom nowotworowym wyjście z guza pierwotnego i tworzenie przerzutów a jednocześnie utrudniają komórkom immunologicznym dotarcie do ognisk nowotworowych. Niedotlenienie guza nie tylko przyciąga progenitorowe komórki śródbłonna, ale również progenitorowe komórki linii monocytarno-makrofagowej, które pod

wpływem środowiska nowotworowego ulegają dewiacji i ostatecznie powstają komórki, które zamiast niszczyć chronią nowotwór. Jak już wyżej wspomniałam niszczenie patologicznych naczyń krwionośnych charakterystycznych dla guza nie przynosi oczekiwanych skutków. Alternatywną strategią może być próba normalizacji unaczynienia guza^{285,286}. Czyli nie niszczenie naczyń, ale ich naprawa. Koncepcja normalizacji naczyń krwionośnych obejmuje i celuje w hipoksję, angiogenezę, odróżnicowanie komórek nowotworowych, oporność na radio i chemoterapię, odbudowanie skutecznej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Ostatnio duże zainteresowanie naukowców skupia się wokół mikroRNA (miR) zaangażowanych w regulację angiogenezy. W przeglądówce opisane są nowe odkrycia dotyczące funkcji i zastosowania miR (angiomiR-y i hypoxamiR-y) szczególnie w normalizacji nieprawidłowej angiogenezy. Badania miR są bardzo obiecujące między innymi dlatego, że niektóre z nich są tkankospecyficzne i wobec tego mogą służyć jako nieinwazyjne biomarkery. Szczególnie interesująca wydaje się identyfikacja miR-ów, które zaangażowane są zarówno w normalizację naczyń i poprawę funkcji komórek odpornościowych w mikrośrodowisku nowotworu. Rysunek 4 przedstawia efekt działania potencjalnie nowej generacji leków przeciwnowotworowych opartych na terapii skojarzonej złożonej z konwencjonalnej chemioterapii i fizjologicznych miR-ów (physioxamiRs) o właściwościach regulujących angiogenezę oraz przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną.



Rysunek 4. Schematyczna reprezentacja terapii skojarzonej z udziałem miR-ów i leczenia konwencjonalnego.

VII. Literatura

- 1 Matejuk, A., Vandenbark, A. A., Burrows, G. G., Bebo, B. F., Jr. & Offner, H. Reduced chemokine and chemokine receptor expression in spinal cords of TCR BV8S2 transgenic mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis with BV8S2 protein. *J Immunol* **164**, 3924-3931 (2000).
- 2 Matejuk, A. *et al.* 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **65**, 529-542 (2001).
- 3 Matejuk, A., Dwyer, J., Zamora, A., Vandenbark, A. A. & Offner, H. Evaluation of the effects of 17beta-estradiol (17beta-e2) on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray. *Endocrinology* **143**, 313-319 (2002).
- 4 Matejuk, A. *et al.* Effects of cytokine deficiency on chemokine expression in CNS of mice with EAE. *J Neurosci Res* **67**, 680-688 (2002).
- 5 Matejuk, A. *et al.* Endogenous CD4+BV8S2- T cells from TG BV8S2+ donors confer complete protection against spontaneous experimental encephalomyelitis (Sp-EAE) in TCR transgenic, RAG-/- mice. *J Neurosci Res* **71**, 89-103, (2003).
- 6 Matejuk, A. *et al.* CNS gene expression pattern associated with spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **73**, 667-678, (2003).
- 7 Matejuk, A., Dwyer, J., Hopke, C., Vandenbark, A. A. & Offner, H. 17Beta-estradiol treatment profoundly down-regulates gene expression in spinal cord tissue in mice protected from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **51**, 185-193 (2003).
- 8 Ito, A. Matejuk, A. *et al.* Transfer of severe experimental autoimmune encephalomyelitis by IL-12- and IL-18-potentiated T cells is estrogen sensitive. *J Immunol* **170**, 4802-4809 (2003).
- 9 Subramanian, S., Matejuk, A., Zamora, A., Vandenbark, A. A. & Offner, H. Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. *J Immunol* **170**, 1548-1555 (2003).
- 10 Matejuk, A. *et al.* Estrogen treatment induces a novel population of regulatory cells, which suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **77**, 119-126, (2004).
- 11 Matejuk, A., Dwyer, J., Hopke, C., Vandenbark, A. A. & Offner, H. Opposing roles for TGF-beta1 and TGF-beta3 isoforms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine* **25**, 45-51 (2004).
- 12 Matejuk, A., Hopke, C., Vandenbark, A. A., Hurn, P. D. & Offner, H. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J Immunol* **174**, 2387-2395 (2005).
- 13 Matejuk, A. & Afentoulis, M. Association of CD45(dim)VLA-4 (+) cells with the NKT cell lineage and their selective expression of IL-13, IP-15, and CCR3 transcripts. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**, 183-191, (2006).
- 14 Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P. & Moreau, T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med* **339**, 285-291, (1998).
- 15 Gray, A., Feldman, H. A., McKinlay, J. B. & Longcope, C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 1016-1025 (1991).
- 16 Whitacre, C. C., Reingold, S. C. & O'Looney, P. A. A gender gap in autoimmunity. *Science* **283**, 1277-1278 (1999).
- 17 Vermeulen, A. Clinical review 24: Androgens in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 221-224 (1991).

- 18 Jansson, L. & Holmdahl, R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **47**, 290-301 (1998).
- 19 Polman, C. H. & Uitdehaag, B. M. New and emerging treatment options for multiple sclerosis. *Lancet neurology* **2**, 563-566 (2003).
- 20 Gold, S. M. & Voskuhl, R. R. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res* **175**, 239-251, (2009).
- 21 Gold, S. M. & Voskuhl, R. R. Estrogen treatment in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **286**, 99-103, (2009).
- 22 Weinberg, A. D. *et al.* Lymphokine mRNA expression in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a host recruited CD45R hi/CD4+ population during recovery. *J Neuroimmunol* **48**, 105-117 (1993).
- 23 Powell, M. B. *et al.* Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *Int Immunol* **2**, 539-544 (1990).
- 24 Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910-1914, (2003).
- 25 Brunda, M. J. Interleukin-12. *J Leukoc Biol* **55**, 280-288 (1994).
- 26 Trinchieri, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* **84**, 4008-4027 (1994).
- 27 Takeda, K. *et al.* Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* **8**, 383-390 (1998).
- 28 Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S. & Dinarello, C. A. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* **101**, 711-721, (1998).
- 29 Robinson, D. *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* **7**, 571-581 (1997).
- 30 Ahn, H. J. *et al.* A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* **159**, 2125-2131 (1997).
- 31 Tomura, M. *et al.* A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3-cells. *J Immunol* **160**, 4738-4746 (1998).
- 32 Leonard, J. P., Waldburger, K. E. & Goldman, S. J. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* **181**, 381-386 (1995).
- 33 Wildbaum, G., Youssef, S., Grabie, N. & Karin, N. Neutralizing antibodies to IFN-gamma-inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **161**, 6368-6374 (1998).
- 34 Segal, B. M., Dwyer, B. K. & Shevach, E. M. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* **187**, 537-546 (1998).
- 35 Shi, F. D., Takeda, K., Akira, S., Sarvetnick, N. & Ljunggren, H. G. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol* **165**, 3099-3104 (2000).
- 36 Iwasaki, M. *et al.* A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* **31**, 2411-2420, (2001).
- 37 Mukai, T. *et al.* IL-12 plays a pivotal role in LFA-1-mediated T cell adhesiveness by up-regulation of CCR5 expression. *J Leukoc Biol* **70**, 422-430 (2001).
- 38 Messague, J., Attisano, L. & Wrana, J. L. The TGF- β superfamily and its composite receptors. *Trends Cell Biol* **4**, 172-176 (1994).

- 39 Unsicker, K., Flanders, K. C., Cissel, D. S., Lafyatis, R. & Sporn, M. B. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* **44**, 613-625 (1991).
- 40 Constam, D. B. *et al.* Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* **148**, 1404-1410 (1992).
- 41 Logan, A., Frautschy, S. A., Gonzalez, A. M., Sporn, M. B. & Baird, A. Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain Res* **587**, 216-225 (1992).
- 42 Roberts, A. B. & Sporn, M. B. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* **32**, 91-98, (1992).
- 43 Johns, L. D. & Sriram, S. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. *J Neuroimmunol* **47**, 1-7 (1993).
- 44 Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F. & Thoenen, H. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* **117**, 395-400 (1992).
- 45 Chen, T. C., Hinton, D. R., Yong, V. W. & Hofman, F. M. TGF-B2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* **73**, 155-161 (1997).
- 46 Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N. & Matsushima, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**, 617-648, (1991).
- 47 Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568, (1998).
- 48 Alam, R., Kumar, D., Anderson-Walters, D. & Forsythe, P. A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *J Immunol* **152**, 1298-1303 (1994).
- 49 Hulkower, K. *et al.* Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **150**, 2525-2533 (1993).
- 50 Karpus, W. J. *et al.* An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **155**, 5003-5010 (1995).
- 51 Godiska, R., Chantry, D., Dietsch, G. N. & Gray, P. W. Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **58**, 167-176 (1995).
- 52 Miyagishi, R., Kikuchi, S., Takayama, C., Inoue, Y. & Tashiro, K. Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. *J Neuroimmunol* **77**, 17-26 (1997).
- 53 Glabinski, A. R., Tani, M., Strieter, R. M., Tuohy, V. K. & Ransohoff, R. M. Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* **150**, 617-630 (1997).
- 54 Ransohoff, R. M. *et al.* Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Faseb J* **7**, 592-600 (1993).
- 55 Karpus, W. J. & Kennedy, K. J. MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol* **62**, 681-687 (1997).
- 56 Kennedy, K. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W. & Karpus, W. J. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemotactic protein-1. *J Neuroimmunol* **92**, 98-108 (1998).

- 57 Jiang, Y. *et al.* Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **86**, 1-12 (1998).
- 58 Sorensen, T. L. *et al.* Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* **103**, 807-815, (1999).
- 59 Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L. & Hancock, W. W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6873-6878 (1999).
- 60 Bebo, B. F., Jr., Vandenberg, A. A. & Offner, H. Male SJL mice do not relapse after induction of EAE with PLP 139-151. *J Neurosci Res* **45**, 680-689, (1996).
- 61 Cua, D. J., Hinton, D. R. & Stohlman, S. A. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol* **155**, 4052-4059 (1995).
- 62 Voskuhl, R. R., Pitchekian-Halabi, H., MacKenzie-Graham, A., McFarland, H. F. & Raine, C. S. Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol* **39**, 724-733, (1996).
- 63 Bebo, B. F., Jr., Schuster, J. C., Vandenberg, A. A. & Offner, H. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *J Immunol* **162**, 35-40 (1999).
- 64 Bebo, B. F., Jr., Schuster, J. C., Vandenberg, A. A. & Offner, H. Gender differences in experimental autoimmune encephalomyelitis develop during the induction of the immune response to encephalitogenic peptides. *J Neurosci Res* **52**, 420-426 (1998).
- 65 Smith, M. E. & Eller, N. L. Gender influences EAE both before and after sexual maturation. *FASEB J.* **10**: A1353 (1996).
- 66 Bebo, B. F., Jr. *et al.* Gonadal hormones influence the immune response to PLP 139-151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **84**, 122-130 (1998).
- 67 Ahmed, S. A. & Penhale, W. J. The influence of testosterone on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats. *Clin Exp Immunol* **48**, 367-374 (1982).
- 68 Harbuz, M. S., Perveen-Gill, Z., Lightman, S. L. & Jessop, D. S. A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. *Br J Rheumatol* **34**, 1117-1122 (1995).
- 69 Evron, S., Brenner, T. & Abramsky, O. Suppressive effect of pregnancy on the development of experimental allergic encephalomyelitis in rabbits. *Am J Reprod Immunol* **5**, 109-113 (1984).
- 70 Mertin, L. A. & Rumjanek, V. M. Pregnancy and the susceptibility of Lewis rats to experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* **68**, 15-24 (1985).
- 71 Jansson, L., Olsson, T. & Holmdahl, R. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol* **53**, 203-207 (1994).
- 72 Trooster, W. J. *et al.* Suppression of acute experimental allergic encephalomyelitis by the synthetic sex hormone 17-alpha-ethinylestradiol: an immunological study in the Lewis rat. *Int Arch Allergy Immunol* **102**, 133-140 (1993).
- 73 Bebo, B. F., Jr. *et al.* Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol* **166**, 2080-2089 (2001).
- 74 Offner, H. *et al.* A synthetic androstene derivative and a natural androstene metabolite inhibit relapsing-remitting EAE. *J Neuroimmunol* **130**, 128-139 (2002).
- 75 Latham, K. A. *et al.* Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J Immunol* **171**, 5820-5827 (2003).
- 76 Kim, S., Liva, S. M., Dalal, M. A., Verity, M. A. & Voskuhl, R. R. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology* **52**, 1230-1238 (1999).
- 77 Bebo, B. F., Jr. *et al.* Gender differences in protection from EAE induced by oral tolerance with a peptide analogue of MBP-Ac1-11. *J Neurosci Res* **55**, 432-440 (1999).

- 78 Medina, K. L., Smithson, G. & Kincade, P. W. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* **178**, 1507-1515 (1993).
- 79 Jansson, L., Mattsson, A., Mattsson, R. & Holmdahl, R. Estrogen induced suppression of collagen arthritis. V: Physiological level of estrogen in DBA/1 mice is therapeutic on established arthritis, suppresses anti-type II collagen T-cell dependent immunity and stimulates polyclonal B-cell activity. *J Autoimmun* **3**, 257-270 (1990).
- 80 Carlsten, H., Tarkowski, A., Holmdahl, R. & Nilsson, L. A. Oestrogen is a potent disease accelerator in SLE-prone MRL lpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* **80**, 467-473 (1990).
- 81 Nicol, T., Bilbey, D. L., Charles, L. M., Cordingley, J. L. & Vernon-Roberts, B. Oestrogen: The Natural Stimulant of Body Defence. *J Endocrinol* **30**, 277-291 (1964).
- 82 Vernon-Roberts, B. The effects of steroid hormones on macrophage activity. *International review of cytology* **25**, 131-159 (1969).
- 83 Pfeifer, R. W. & Patterson, R. M. Modulation of nonspecific cell-mediated growth inhibition by estrogen metabolites. *Immunopharmacology* **10**, 127-135 (1985).
- 84 Nilsson, N. & Carlsten, H. Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal B cell activation. *Cell Immunol* **158**, 131-139, (1994).
- 85 Griffith, J. S. *et al.* Evidence for the genetic control of estradiol-regulated responses. Implications for variation in normal and pathological hormone-dependent phenotypes. *Am J Pathol* **150**, 2223-2230 (1997).
- 86 Smithson, G., Medina, K., Ponting, I. & Kincade, P. W. Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. *J Immunol* **155**, 3409-3417 (1995).
- 87 Fotsis, T. *et al.* The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* **368**, 237-239, (1994).
- 88 Rubanyi, G. M. *et al.* Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* **99**, 2429-2437, (1997).
- 89 Kawashima, K. *et al.* The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* **143**, 2750-2758 (2002).
- 90 Carlsten, H., Verdrengh, M. & Taube, M. Additive effects of suboptimal doses of estrogen and cortisone on the suppression of T lymphocyte dependent inflammatory responses in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **45**, 26-30 (1996).
- 91 Carlsten, H., Holmdahl, R., Tarkowski, A. & Nilsson, L. A. Oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in autoimmune (NZB/NZW)F1 mice is a trait inherited from the healthy NZW parental strain. *Immunology* **67**, 205-209 (1989).
- 92 Hu, S. K., Mitcho, Y. L. & Rath, N. C. Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *International journal of immunopharmacology* **10**, 247-252 (1988).
- 93 Guerne, P. A., Carson, D. A. & Lotz, M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* **144**, 499-505 (1990).
- 94 Chao, T. C., Van Alten, P. J., Greager, J. A. & Walter, R. J. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell Immunol* **160**, 43-49 (1995).
- 95 Salem, M. L., Hossain, M. S. & Nomoto, K. Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF-alpha and IFN-gamma. *Int Arch Allergy Immunol* **121**, 235-245, (2000).
- 96 Gilmore, W., Weiner, L. P. & Correale, J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* **158**, 446-451 (1997).

- 97 Correale, J., Arias, M. & Gilmore, W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* **161**, 3365-3374 (1998).
- 98 Ito, A. *et al.* Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol* **167**, 542-552 (2001).
- 99 Ito, A. *et al.* Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha(+) T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. *Clin Immunol* **102**, 275-282, (2002).
- 100 Liu, H. Y. *et al.* Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res* **70**, 238-248, (2002).
- 101 Offner, H., Adlard, K., Zamora, A. & Vandenbark, A. A. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. *J Clin Invest* **105**, 1465-1472, (2000).
- 102 Lampert, P. Electron microscopic studies on ordinary and hyperacute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta neuropathologica* **9**, 99-126 (1967).
- 103 McColl, S. R. *et al.* Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **161**, 6421-6426 (1998).
- 104 Han, K. H., Han, K. O., Green, S. R. & Quehenberger, O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *Journal of lipid research* **40**, 1053-1063 (1999).
- 105 Goodkin, D. E. *et al.* A phase II study of i.v. methylprednisolone in secondary-progressive multiple sclerosis. *Neurology* **51**, 239-245 (1998).
- 106 Sellebjerg, F., Frederiksen, J. L., Nielsen, P. M. & Olesen, J. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of oral, high-dose methylprednisolone in attacks of MS. *Neurology* **51**, 529-534 (1998).
- 107 Offner, H. *et al.* Vaccination with BV8S2 protein amplifies TCR-specific regulation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis in TCR BV8S2 transgenic mice. *J Immunol* **161**, 2178-2186 (1998).
- 108 Jones, R. E., Bourdette, D. N., Whitham, R. H., Offner, H. & Vandenbark, A. A. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in severe combined immunodeficient mice reconstituted with allogeneic or xenogeneic hematopoietic cells. *J Immunol* **150**, 4620-4629 (1993).
- 109 Anawalt, B. D. & Merriam, G. R. Neuroendocrine aging in men. Andropause and somatopause. *Endocrinol Metab Clin North Am* **30**, 647-669 (2001).
- 110 Simerly, R. B. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci* **13**, 104-110 (1990).
- 111 Lu, S. F., McKenna, S. E., Cologer-Clifford, A., Nau, E. A. & Simon, N. G. Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation. *Endocrinology* **139**, 1594-1601 (1998).
- 112 DonCarlos, L. L., Garcia-Ovejero, D., Sarkey, S., Garcia-Segura, L. M. & Azcoitia, I. Androgen receptor immunoreactivity in forebrain axons and dendrites in the rat. *Endocrinology* **144**, 3632-3638 (2003).
- 113 Antel, J. P., Bania, M. B., Reder, A. & Cashman, N. Activated suppressor cell dysfunction in progressive multiple sclerosis. *J Immunol* **137**, 137-141 (1986).
- 114 Antel, J. P., Arnason, B. G. & Medof, M. E. Suppressor cell function in multiple sclerosis: correlation with clinical disease activity. *Ann Neurol* **5**, 338-342, (1979).
- 115 Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. & Lafaille, J. J. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **188**, 1883-1894 (1998).

- 116 Van de Keere, F. & Tonegawa, S. CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* **188**, 1875-1882 (1998).
- 117 Mordes, J. P. *et al.* Transfusions enriched for W3/25+ helper/inducer T lymphocytes prevent spontaneous diabetes in the BB/W rat. *Diabetologia* **30**, 22-26 (1987).
- 118 Boitard, C., Yasunami, R., Dardenne, M. & Bach, J. F. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* **169**, 1669-1680 (1989).
- 119 Furtado, G. C. *et al.* Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* **182**, 122-134 (2001).
- 120 Vandenberg, A. A., Hashim, G. & Offner, H. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* **341**, 541-544, (1989).
- 121 Kumar, V. & Sercarz, E. E. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* **178**, 909-916 (1993).
- 122 Kumar, V., Stellrecht, K. & Sercarz, E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Exp Med* **184**, 1609-1617 (1996).
- 123 Mason, D. & Powrie, F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* **10**, 649-655 (1998).
- 124 Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* **2**, 816-822, (2001).
- 125 Roncarolo, M. G. & Levings, M. K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 676-683 (2000).
- 126 Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A. & Miller, S. D. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **169**, 4712-4716 (2002).
- 127 Green, E. A., Choi, Y. & Flavell, R. A. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* **16**, 183-191 (2002).
- 128 Wormley, F. L., Jr. *et al.* Evidence for a unique expression of CD4 on murine vaginal CD4+ cells. *Immunology* **100**, 300-308 (2000).
- 129 Johansson, M. & Lycke, N. A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract. *J Immunol* **170**, 1659-1666 (2003).
- 130 Young, K. J. & Zhang, L. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Human immunology* **63**, 926-934 (2002).
- 131 Polanczyk, M. *et al.* The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol* **163**, 1599-1605 (2003).
- 132 Page, S. T. *et al.* Intestinal intraepithelial lymphocytes include precursors committed to the T cell receptor alpha beta lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9459-9464 (1998).
- 133 Guy-Grand, D. *et al.* Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* **173**, 471-481 (1991).
- 134 Lefrancois, L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* **147**, 1746-1751 (1991).
- 135 Poussier, P. & Julius, M. Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu Rev Immunol* **12**, 521-553, (1994).

- 136 Rocha, B., Guy-Grand, D. & Vassalli, P. Extrathymic T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **7**, 235-242 (1995).
- 137 Bruno, L., Rocha, B., Rolink, A., von Boehmer, H. & Rodewald, H. R. Intra- and extra-thymic expression of the pre-T cell receptor alpha gene. *Eur J Immunol* **25**, 1877-1882, (1995).
- 138 Young, D. A. *et al.* IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **164**, 3563-3572 (2000).
- 139 Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* **1**, 459-460, (2000).
- 140 Fuss, I. J. *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **113**, 1490-1497 (2004).
- 141 Bonecchi, R. *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**, 129-134 (1998).
- 142 Joyce, M. M. *et al.* Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. *Endocrinology* **146**, 675-684 (2005).
- 143 Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241 (1997).
- 144 Tang, Z. L. *et al.* Nitric oxide decreases the sensitivity of pulmonary endothelial cells to LPS-induced apoptosis in a zinc-dependent fashion. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 211-217 (2002).
- 145 Vogt, M., Bauer, M. K., Ferrari, D. & Schulze-Osthoff, K. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett* **429**, 67-72 (1998).
- 146 Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132 (1997).
- 147 Blomer, U., Kafri, T., Randolph-Moore, L., Verma, I. M. & Gage, F. H. Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2603-2608 (1998).
- 148 Apostolou, I. *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* **96**, 5141-5146 (1999).
- 149 Evans, W. E. & Relling, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286**, 487-491 (1999).
- 150 Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
- 151 Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E. & Steiner, H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10078-10082 (1998).
- 152 Massaro, A. R. Are there indicators of remyelination in blood or CSF of multiple sclerosis patients? *Mult Scler* **4**, 228-231 (1998).
- 153 Paz, A. *et al.* Phenotyping analysis of peripheral blood leukocytes in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* **6**, 347-352 (1999).
- 154 Peach, R. J. *et al.* Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med* **180**, 2049-2058 (1994).
- 155 Lu, D. & Giguere, V. Requirement of Ras-dependent pathways for activation of the transforming growth factor beta3 promoter by estradiol. *Endocrinology* **142**, 751-759 (2001).
- 156 Klarlund, J. K. *et al.* Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**, 1927-1930 (1997).
- 157 Mueller, C. G. *et al.* Polymerase chain reaction selects a novel disintegrin proteinase from CD40-activated germinal center dendritic cells. *J Exp Med* **186**, 655-663 (1997).

- 158 Okamura, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91 (1995).
- 159 Nighswonger, A. M., Austin, K. J., Ealy, A. D., Han, C. S. & Hansen, T. R. Rapid communication: the ovine cDNA encoding interferon-stimulated gene product 17 (ISG17). *J Anim Sci* **78**, 1393-1394 (2000).
- 160 Smith, J. B. & Herschman, H. R. The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, and GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains. *Arch Biochem Biophys* **330**, 290-300 (1996).
- 161 Karpus, W. J., Kennedy, K. J., Kunkel, S. L. & Lukacs, N. W. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. *J Exp Med* **187**, 733-741 (1998).
- 162 Karpus, W. J. & Lukacs, N. W. The role of chemokines in oral tolerance. Abrogation of nonresponsiveness by treatment with antimonocyte chemotactic protein-1. *Ann N Y Acad Sci* **778**, 133-144 (1996).
- 163 Cid, M. C. *et al.* Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* **93**, 17-25 (1994).
- 164 Nakai, K. *et al.* Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* **54**, PL221-227 (1994).
- 165 Secor, V. H., Secor, W. E., Gutekunst, C. A. & Brown, M. A. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* **191**, 813-822 (2000).
- 166 Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**, 875-883 (1998).
- 167 Parmacek, M. S., Karpinski, B. A., Gottesdiener, K. M., Thompson, C. B. & Leiden, J. M. Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res* **17**, 1915-1931 (1989).
- 168 Suga, K. *et al.* CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1. *FEBS Lett* **489**, 249-253 (2001).
- 169 Ikejima, K. *et al.* Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol* **274**, G669-676 (1998).
- 170 Encinas, J. A., Weiner, H. L. & Kuchroo, V. K. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **45**, 655-669 (1996).
- 171 Egerer, K. *et al.* Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol* **29**, 2045-2052 (2002).
- 172 Nataf, S., Carroll, S. L., Wetsel, R. A., Szalai, A. J. & Barnum, S. R. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. *J Immunol* **165**, 5867-5873 (2000).
- 173 Dietzschold, B. *et al.* Expression of C1q, a subcomponent of the rat complement system, is dramatically enhanced in brains of rats with either Borna disease or experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* **130**, 11-16 (1995).
- 174 Boylan, M. T. *et al.* Interferon-beta1a administration results in a transient increase of serum amyloid A protein and C-reactive protein: comparison with other markers of inflammation. *Immunol Lett* **75**, 191-197 (2001).
- 175 Ristori, G. *et al.* Serum amyloid A protein is elevated in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **88**, 9-12 (1998).
- 176 Ibrahim, S. M. *et al.* Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **124**, 1927-1938 (2001).

- 177 Simpson, J. E., Newcombe, J., Cuzner, M. L. & Woodroffe, M. N. Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 133-142 (2000).
- 178 Veenstra, K. G., Jonak, Z. L., Trulli, S. & Gollob, J. A. IL-12 induces monocyte IL-18 binding protein expression via IFN-gamma. *J Immunol* **168**, 2282-2287 (2002).
- 179 Vestal, D. J. *et al.* Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 977-985 (1998).
- 180 Carlow, D. A., Marth, J., Clark-Lewis, I. & Teh, H. S. Isolation of a gene encoding a developmentally regulated T cell-specific protein with a guanine nucleotide triphosphate-binding motif. *J Immunol* **154**, 1724-1734 (1995).
- 181 Sorace, J. M., Johnson, R. J., Howard, D. L. & Drysdale, B. E. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J Leukoc Biol* **58**, 477-484 (1995).
- 182 Riemer, C. *et al.* BSE, scrapie, and vCJD: infectious neurodegenerative diseases. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 85-103 (2002).
- 183 Taylor, G. A. *et al.* Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J Biol Chem* **271**, 20399-20405 (1996).
- 184 Wolf, H. M. *et al.* Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. *Blood* **83**, 1278-1288 (1994).
- 185 Raine, C. S., Bonetti, B. & Cannella, B. Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated plaque. *Rev Neurol (Paris)* **154**, 577-585 (1998).
- 186 Schabet, M. *et al.* The use of protease inhibitors in experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* **31**, 265-272 (1991).
- 187 Hunter, M. I., Nlemadim, B. C. & Davidson, D. L. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochem Res* **10**, 1645-1652 (1985).
- 188 Castillo, M., Zafra, M. F. & Garcia-Peregrin, E. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* **13**, 551-555 (1988).
- 189 Dorszewska, J. & Adamczewska-Goncerzewicz, Z. Patterns of free and esterified sterol fractions of the cerebral white matter in severe and moderate experimental hypoxia. *Med Sci Monit* **6**, 227-231 (2000).
- 190 Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. & Greenberg, D. A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15306-15311, (2001).
- 191 Mahe, D., Fisson, S., Montoni, A., Morel, A. & Couez, D. Identification and IFN-gamma-regulation of differentially expressed mRNAs in murine microglial and CNS-associated macrophage subpopulations. *Mol Cell Neurosci* **18**, 363-380 (2001).
- 192 Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **8**, 500-508 (2002).
- 193 Shimizu-Okabe, C. *et al.* Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* **12**, 2747-2751 (2001).
- 194 Eberhard, D. A., Brown, M. D. & VandenBerg, S. R. Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits), IV, and VI in the human hippocampus. *Am J Pathol* **145**, 640-649 (1994).
- 195 Abdul-Majid, K. B. *et al.* Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* **55**, 70-81 (2002).

- 196 Kawai, K. *et al.* Intrathecal administration of antibodies against LFA-1 and against ICAM-1 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Cell Immunol* **171**, 262-268, (1996).
- 197 Ramprasad, M. P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O. & Steinberg, D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14833-14838 (1996).
- 198 Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H. & Miura, M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J Exp Med* **193**, 111-122 (2001).
- 199 Walsh, L. A., Tone, M., Thiru, S. & Waldmann, H. The CD59 antigen--a multifunctional molecule. *Tissue antigens* **40**, 213-220 (1992).
- 200 Chabas, D. *et al.* The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* **294**, 1731-1735 (2001).
- 201 Elloso, M. M., Phiel, K., Henderson, R. A., Harris, H. A. & Adelman, S. J. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. *J Endocrinol* **185**, 243-252 (2005).
- 202 Gold, S. M. *et al.* Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ERalpha). *Lab Invest* **89**, 1076-1083 (2009).
- 203 Morales, L. B. *et al.* Treatment with an estrogen receptor alpha ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* **26**, 6823-6833 (2006).
- 204 Spence, R. D. *et al.* Neuroprotection mediated through estrogen receptor-alpha in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8867-8872 (2011).
- 205 Tiwari-Woodruff, S., Morales, L. B., Lee, R. & Voskuhl, R. R. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14813-14818 (2007).
- 206 Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Dervin, S. M., O'Dell, T. J. & Voskuhl, R. R. Estriol preserves synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *Lab Invest* (2012).
- 207 MacKenzie-Graham, A. J. *et al.* Estrogen treatment prevents gray matter atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* **90**, 1310-1323 (2012).
- 208 Bebo, B. F., Jr. *et al.* Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **57**, 777-790 (2009).
- 209 Wang, C. *et al.* Membrane estrogen receptor regulates experimental autoimmune encephalomyelitis through up-regulation of programmed death 1. *J Immunol* **182**, 3294-3303 (2009).
- 210 Wang, C. *et al.* Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. *Immunology* **126**, 329-335 (2009).
- 211 Blasko, E. *et al.* Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **214**, 67-77 (2009).
- 212 Bodhankar, S., Wang, C., Vandenbark, A. A. & Offner, H. Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. *Eur J Immunol* **41**, 1165-1175 (2011).
- 213 Garidou, L. *et al.* Estrogen receptor alpha signaling in inflammatory leukocytes is dispensable for 17beta-estradiol-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **173**, 2435-2442 (2004).
- 214 Lelu, K. *et al.* Endogenous estrogens, through estrogen receptor alpha, constrain autoimmune inflammation in female mice by limiting CD4+ T-cell homing into the CNS. *Eur J Immunol* **40**, 3489-3498 (2010).

- 215 Lelu, K. *et al.* Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **187**, 2386-2393 (2011).
- 216 Papenfuss, T. L. *et al.* Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. *J Immunol* **186**, 3346-3355 (2011).
- 217 Garcia-Ovejero, D., Veiga, S., Garcia-Segura, L. M. & DonCarlos, L. L. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* **450**, 256-271 (2002).
- 218 Giraud, S. N., Caron, C. M., Pham-Dinh, D., Kitabgi, P. & Nicot, A. B. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFkappaB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8416-8421 (2010).
- 219 Sicotte, N. L. *et al.* Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study. *Arch Neurol* **64**, 683-688 (2007).
- 220 Gold, S. M., Chalifoux, S., Giesser, B. S. & Voskuhl, R. R. Immune modulation and increased neurotrophic factor production in multiple sclerosis patients treated with testosterone. *J Neuroinflammation* **5**, 32 (2008).
- 221 Sicotte, N. L. *et al.* Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol* **52**, 421-428 (2002).
- 222 Soldan, S. S., Alvarez Retuerto, A. I., Sicotte, N. L. & Voskuhl, R. R. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol. *J Immunol* **171**, 6267-6274 (2003).
- 223 Trapp, B. D. & Nave, K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* **31**, 247-269 (2008).
- 224 Du, S., Sandoval, F., Trinh, P. & Voskuhl, R. R. Additive effects of combination treatment with anti-inflammatory and neuroprotective agents in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **219**, 64-74 (2010).
- 225 Tan, E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* **44**, 93-151 (1989).
- 226 Theofilopoulos, A. N. & Dixon, F. J. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* **37**, 269-390 (1985).
- 227 Madaio, M. P. *et al.* Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *J Immunol* **138**, 2883-2889 (1987).
- 228 Raz, E., Brezis, M., Rosenmann, E. & Eilat, D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* **142**, 3076-3082 (1989).
- 229 Ehrenstein, M. R. *et al.* Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int* **48**, 705-711 (1995).
- 230 Lefkowitz, J. B. & Gilkeson, G. S. Nephritogenic autoantibodies in lupus: current concepts and continuing controversies. *Arthritis Rheum* **39**, 894-903 (1996).
- 231 Liang, Z. *et al.* Pathogenic profiles and molecular signatures of antinuclear autoantibodies rescued from NZM2410 lupus mice. *J Exp Med* **199**, 381-398 (2004).
- 232 Goodnow, C. C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682 (1988).
- 233 Nemazee, D. A. & Burki, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562-566 (1989).
- 234 Tiegs, S. L., Russell, D. M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-1020 (1993).
- 235 Chen, C., Nagy, Z., Prak, E. L. & Weigert, M. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* **3**, 747-755 (1995).
- 236 Chen, C. *et al.* The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* **373**, 252-255 (1995).
- 237 Chen, C., Prak, E. L. & Weigert, M. Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity* **6**, 97-105 (1997).

- 238 Chen, C. *et al.* Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J Immunol* **152**, 1970-1982 (1994).
- 239 Guilbert, B., Dighiero, G. & Avrameas, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol* **128**, 2779-2787 (1982).
- 240 Dighiero, G., Lymberi, P., Guilbert, B., Ternynck, T. & Avrameas, S. Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* **475**, 135-145 (1986).
- 241 Hartman, A. B. *et al.* Organ reactive autoantibodies from non-immunized adult BALB/c mice are polyreactive and express non-biased VH gene usage. *Mol Immunol* **26**, 359-370 (1989).
- 242 Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. & Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* **7**, 812-818 (1995).
- 243 Flajnik, M. F. & Ruffell, L. L. Early and natural antibodies in non-mammalian vertebrates. *Curr Top Microbiol Immunol* **252**, 233-240 (2000).
- 244 Chen, Z. J. *et al.* Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. *Eur J Immunol* **28**, 989-994 (1998).
- 245 Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J. & Cohen, I. R. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest* **117**, 712-718 (2007).
- 246 Dighiero, G. *et al.* High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* **134**, 765-771 (1985).
- 247 Hooijkaas, H., Benner, R., Pleasants, J. R. & Wostmann, B. S. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol* **14**, 1127-1130 (1984).
- 248 Chen, C., Stenzel-Poore, M. P. & Rittenberg, M. B. Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *J Immunol* **147**, 2359-2367 (1991).
- 249 Casali, P. & Schettino, E. W. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* **210**, 167-179 (1996).
- 250 Ochsenbein, A. F. *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159 (1999).
- 251 Baumgarth, N., Tung, J. W. & Herzenberg, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 347-362 (2005).
- 252 Zhou, Z. H., Tzioufas, A. G. & Notkins, A. L. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun* **29**, 219-228 (2007).
- 253 Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S. & Elkon, K. B. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* **42**, 781-787 (2005).
- 254 Tian, Q. *et al.* B cells expressing a natural polyreactive autoantibody have a distinct phenotype and are overrepresented in immunoglobulin heavy chain transgenic mice. *J Immunol* **177**, 2412-2422 (2006).
- 255 Matejuk, A. *et al.* Exclusion of natural autoantibody-producing B cells from IgG memory B cell compartment during T cell-dependent immune responses. *J Immunol* **182**, 7634-7643 (2009).
- 256 Pugh-Bernard, A. E. *et al.* Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J Clin Invest* **108**, 1061-1070 (2001).
- 257 Yurasov, S. *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **201**, 703-711 (2005).
- 258 Samuels, J., Ng, Y. S., Coupillaud, C., Paget, D. & Meffre, E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* **201**, 1659-1667 (2005).
- 259 Boes, M. *et al.* Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1184-1189 (2000).

- 260 Ehrenstein, M. R., Cook, H. T. & Neuberger, M. S. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med* **191**, 1253-1258 (2000).
- 261 Jiang, C. *et al.* Abrogation of lupus nephritis in activation-induced deaminase-deficient MRL/lpr mice. *J Immunol* **178**, 7422-7431 (2007).
- 262 Werwitzke, S. *et al.* Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. *Arthritis Rheum* **52**, 3629-3638 (2005).
- 263 Vassilev, T. *et al.* Normal human immunoglobulin suppresses experimental myasthenia gravis in SCID mice. *Eur J Immunol* **29**, 2436-2442 (1999).
- 264 Li, Q. Z. *et al.* Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *J Clin Invest* **115**, 3428-3439 (2005).
- 265 Witte, T. *et al.* IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. SLE Study Group. *Rheumatol Int* **18**, 85-91 (1998).
- 266 Mannoor, K., Matejuk, A., Xu, Y., Beardall, M. & Chen, C. Expression of natural autoantibodies in MRL-lpr mice protects from lupus nephritis and improves survival. *J Immunol* **188**, 3628-3638 (2012).
- 267 Dus, D., Matejuk, A., Paprocka, M., Kieda, C. & Radzikowski, C. Endogenous lectins and their ligands in human colon carcinoma cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **34** (1996).
- 268 Matejuk, A. & Dus, D. [Animal lectins--structure and function]. *Postepy Hig Med Dosw* **52**, 445-470 (1998).
- 269 Dus, D., Paprocka, M. & Matejuk, A. [Lewis antigens in human colon carcinoma]. *Postepy Hig Med Dosw* **50**, 549-553 (1996).
- 270 Opolski, A. *et al.* Metastatic potential and saccharide antigens expression of human colon cancer cells xenotransplanted into athymic nude mice. *Folia Microbiol (Praha)* **43**, 507-510 (1998).
- 271 Matejuk, A., Leng, Q., Chou, S. T. & Mixson, A. J. Vaccines targeting the neovasculature of tumors. *Vasc Cell* **3**, 7 (2011).
- 272 Rosen, L. S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* **9**, 36-44 (2002).
- 273 Gordan, J. D. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 71-77 (2007).
- 274 Gruber, M. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* **13**, 169-174 (2006).
- 275 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307 (2011).
- 276 Huang, J. *et al.* Vascular remodeling marks tumors that recur during chronic suppression of angiogenesis. *Mol Cancer Res* **2**, 36-42 (2004).
- 277 Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. & O'Reilly, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**, 404-407 (1997).
- 278 Folkman, J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* **275**, 150-154 (1996).
- 279 Matejuk, A. & Shamsuddin, A. IP6 in Cancer Therapy: Past, Present, Future. *Current Cancer Therapy Reviews* **6**, 1-12 (2010).
- 280 Draskovic, P. *et al.* Inositol hexakisphosphate kinase products contain diphosphate and triphosphate groups. *Chemistry & biology* **15**, 274-286 (2008).
- 281 Kersting, M. C., Boyette, M., Massey, J. H. & Ryals, P. E. Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena. *J Eukaryot Microbiol* **50**, 164-168 (2003).
- 282 Cosgrove, D. J. The Isolation of Myo-inositol Pentaphosphates from Hydrolysates of Phytic Acid. *Biochem J* **89**, 172-175 (1963).
- 283 Raboy, V. & Gerbasi, P. Genetics of myo-inositol phosphate synthesis and accumulation. *Sub-cellular biochemistry* **26**, 257-285 (1996).

- 284 Matejuk, A., Collet, G., Nadim, M., Grillon, C. & Kieda, C. MicroRNAs and Tumor Vasculature Normalization: Impact on Anti-Tumor Immune Response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**, 285-299 (2013).
- 285 Jain, R. K. A new target for tumor therapy. *N Engl J Med* **360**, 2669-2671 (2009).
- 286 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 417-427 (2011).

Orlean, 15 sierpnia 2013

A. Matejuk