

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**INFEKCE MAKROFÁGOVÉ LINIE J774.2
BAKTERIÍ *FRANCISELLA TULARENSIS* -
ZMĚNY MEMBRÁNOVÝCH A NITROBUNĚČNÝCH MOLEKUL**

MUDr. Jakub Novosad

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská imunologie

Hradec Králové

2010

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT České Republiky, č. LN00A033 a výzkumného záměru MSM VZ 0021620812.

Student: **MUDr. Jakub Novosad**
Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK a FN v Hradci Králové

Školitelka: **prim. MUDr. Irena Krčmová, CSc.**
Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK a FN v Hradci Králové

Oponenti: doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Univerzita Palackého Olomouc
Lékařská fakulta
Ústav imunologie

RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.
Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové
Ústav molekulární patologie

*Obhajoba disertační práce se koná dne před komisí pro obhajoby
disertačních prací oborové rady Lékařská imunologie v budově Ústavu klinické imunologie
a alergologie LF UK a FN, budova č. 17, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové.*

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

Obsah :

1. Souhrn.....	4
2. Summary.....	5
3. Úvod.....	6
4. Cíle práce.....	7
5. Metodika.....	8
5.1. Použitý materiál.....	8
5.2. Přístrojové vybavení.....	8
5.3. časový protokol pokusů.....	9
5.4. Kultivace, infekce a stimulace buněk.....	9
5.5. Životnost buněk a proliferace bakterií.....	10
5.6. Průtokově cytometrická analýza.....	10
5.7. Měření produkce NO v supernatantu.....	11
5.8. Statistické zpracování dat.....	11
6. Souhrn výsledků.....	12
6.1. Fenotypové změny.....	12
6.1.1. Exprese CD54.....	12
6.1.2. Exprese CD16/32.....	14
6.1.3. Exprese CD86.....	15
6.1.4. Kombinace znaků.....	17
6.2. Produkce NO.....	17
6.3. Praktické výstupy.....	18
7. Odpovědi na otázky formulované v úvodu.....	20
8. Diskuze.....	21
9. Závěr.....	22
10. Použitá literatura.....	23
11. Přehled publikační činnosti autora.....	27

1. Souhrn:

Úvod: *Francisella tularensis* (F.t.) je fakultativně intracelulárně rostoucí, gram negativní bakterie, způsobující onemocnění tularémie. Díky svým ojedinělým biologickým vlastnostem byla Centrem pro kontrolu chorob (CDC) v USA zařazena v souvislosti s nebezpečím jejího zneužití při vývoji biologických zbraní a bioterorismu mezi vysoce rizikové infekční agens (kategorie A). I přes intenzivní výzkum na poli imunobiologie infekce F.t. zůstává stále mnoho nezodpovězených otázek. Naše práce byla zaměřena na analýzu povrchové exprese molekul CD54, CD86 a CD16/32 a produkce oxidu dusnatého (NO) myší monocyto-makrofágovou linií J774.2 v průběhu primární infekce F.t. kmenem LVS *in vitro* a při předchozí či následné stimulaci lipopolysacharidem (LPS) a/nebo interferonem gama (IFN γ).

Metodika: Exprese povrchových molekul byla měřena pomocí průtokového cytometru 3, 6, 9, 12 a 24 hodin po zahájení infekce a stimulace a byla hodnocena absolutní hodnota průměrné fluorescence (MFI) a její změny v čase (Δ MFI). Produkce NO v buněčném supernatantu byla analyzována Griessovou metodou, ve stejných časových intervalech. Myší monocyto-makrofágová linie J774.2 byla kultivována v kultivačních lahvích v přítomnosti média Dulbecco's MEM s obsahem glutamátu a 10% fetálního bovinního séra (FBS) (2×10^6 buněk/10ml média). Buňky byly dále infikovány F.t. kmenem LVS (Live Vaccine Strain - kultivována na McLeodově agaru) při multiplicitě infekce 1:100. 3 hodiny před infekcí nebo 3 hod. po infekci byly buňky dále stimulovány LPS (10 nebo 50 ng/ml média) a/nebo IFN γ (100 nebo 1000 IU/ml média). Čas 0 byl stanoven na okamžik, kdy byly v systému přítomny všechny složky (t.j. infekce i stimulační agens). Proliferace F.t. LVS byla rovněž v jednotlivých intervalech hodnocena pomocí kultivace suspenze infikovaných buněk na McLeodově agaru a určením počtu kolonie formujících jednotek (CFU) F.t.

Výsledky: Absolutní a relativní hodnoty průměrné fluorescence (MFI) molekul CD54, CD86 a CD16/32, stejně tak jako produkce NO v buněčném supernatantu po stimulaci a/nebo infekci makrofágů F.t. LVS jsou velmi senzitivními indikátory stimulace buněk a zároveň užitečnými prediktory následné eliminace infekce. K jejímu dosažení bylo zpravidla zapotřebí stimulace makrofágů kombinací LPS a IFN γ , bez ohledu na časové schéma a použité dávky stimulačních agens.

Závěr: Měření exprese molekul CD54, CD86 a CD16/32 pomocí MFI, stejně tak jako analýza produkce NO infikovanými buňkami se ukázala být velmi užitečným pomocným parametrem, který predikuje eliminaci infekce s vysokou senzitivitou i specificitou.

2. Summary:

Background: *Francisella tularensis* (F.t.) is a facultative intracellular bacteria, enrolled at the list of Centre for Disease Control (CDC) as a high risk bioterrorism agent, category A. There is a long-term effort to understand to the immunopathogenesis of F.t. infection. The aim of our study was focused on phenotype analysis (CD54, CD16/32 and CD86) and nitric oxide (NO) production analysis of murine macrophage-like cell line J774.2 during F.t. live vaccine strain (LVS) *in vitro* infection. J774.2 cells were either untreated or stimulated either before or after F.t. infection by interferon gamma (IFN γ), lipopolysaccharide (LPS) separately or in its combination.

Method: We followed up the expression of cell surface markers and NO production 3, 6, 9, 12 and 24 hours after initiation of infection with or without stimulation using flow cytometry and Griess method respectively. The expression was followed as either absolute value of mean fluorescence index (MFI) or as relative change of MFI (Δ MFI). Murine macrophage-like cells (J774.2) were incubated in cultivation flasks (2×10^6 cells/10ml of medium Dulbecco's MEM with Glutamax-1 with 10% BSA). The cells were activated with 10 or 50 ng of LPS / 1ml of medium or with 100 or 1 000 I.U. of IFN γ / 1ml of medium separately or in combination (10 ng/ml and 100 IU/ml or 50 ng/ml and 1000 IU/ml) and infected by *F. tularensis* LVS with multiplication of infection 1:100 in particular time schemes. F.t. proliferation was assessed by colony forming units (CFU) counts after 24 hours cultivation of cell supernatant on McLeod agar.

Results: Both absolute values and relative changes of mean fluorescences (MFI) of CD54, CD86 and CD16/32 and concentration of NO in cell supernatant are very sensitive predictors of effective macrophages activation and subsequent infection elimination. It was especially pronounced in the case of J774 cells stimulation with combination of IFN γ and LPS regardless time scheme of stimulation.

Conclusion: Measurement of expression of surface markers CD54, CD86 and CD16/32, as well as NO production seem to be very usefull approach to predict with high sensitivity and specificity the outcome of *in vitro* F.t. infection.

3. Úvod

Francisella tularensis je gram-negativní, nesporulující, fakultativně intracelulární patogen zodpovědný za endemicky se vyskytující onemocnění – tularemii. Ačkoliv toto onemocnění v současné době zdánlivě nepředstavuje větší společensko-medicínský problém, pravý opak je pravdou. Existují důkazy o tom, že díky svým ojedinělým biologickým vlastnostem (odolnost a mimořádně vysoká infekciozita – LD₅₀ u virulentních kmenů pro člověka nepřesahuje 10 CFU (kolonie formujících jednotek)) byla *Francisella tularensis* (*F.t.*) v minulosti zneužita k vojenským cílům jako biologická zbraň a je proto od roku 2002 Centrem pro kontrolu nemocí (CDC) v USA zařazena mezi nejrizikovější potenciálně zneužitelné infekční agens v rámci vývoje biologických zbraní a bioterorismu (skupina A zahrnuje kromě *Francisella tularensis* i *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum*, viry pravých neštovic, Eboly a horečky Marburg)[1-3].

Není překvapující, že bylo vyvinuto enormní úsilí k objasnění imunopatogeneze onemocnění se zaměřením na faktory virulence s cílem vyvinout účinnou a bezpečnou vakcínu. Přestože již v padesátých letech minulého století byla využita u exponovaných jedinců v USA vakcína obsahující oslabený kmen *Francisella tularensis* LVS (live vaccine strain, *F.t.* LVS), nebyla doposud schválena pro široké klinické využití. Retrospektivní analýza totiž prokázala, že její účinnost proti virulentním kmenům není 100% a navíc existují nejasnosti ohledně metodiky její přípravy a bezpečnosti[4;5].

Současný výzkum se opírá jednak o analýzu atenuovaných a virulentních kmenů francisel se zaměřením na rozdíly v genetické výbavě a proteinové produkci a jednak o modelování primární infekce *in vitro* či pokusy *in vivo* na zvířecích modelech. Doposud tak byl zmapován bakteriální genom i proteom [6-11], byly definovány genové úseky kódující nejpravděpodobnější faktory virulence[12-14] i obecné zákonitosti v reakci imunitního systému na infekci a zároveň i některé možné mechanismy úniku *F.t.* z jeho dosahu[15-18].

Nadále však nejsou bezezbytku jasné okolnosti samotného vstupu bakterie do buňky a zejména jejího úniku z nebezpečného prostředí fagolysozómu[13;19-21], stejně tak, jako některé konkrétní mechanismy modulace imunitní odpovědi hostitele vedoucí k vytvoření vhodného prostředí pro další proliferaci infekce[22-24].

Z metodologického hlediska je třeba konstatovat, že využití průtokové cytometrie v rámci výzkumu vzájemné interakce mezi bakterií a hostitelskou buňkou stojí spíše ve stínu genomických a proteomických studií. V tomto ohledu byly publikovány práce mapující intracelulární výskyt infekce *F.t.* s využitím geneticky upravené bakterie produkující zelený fluorescenční protein (GFP)[25;26], dále např. práce zabývající se cytoplazmatickou

cytokinovou produkci infikovaných buněk[27], typy buněk hostitelova imunitního systému podléhající infekci[28] či změny související s infekcí a indukcí imunitní paměti[29;30]. Průtoková cytometrie byla rovněž využita jako diagnostická metoda pro přítomnost bakterií s využitím značených monoklonálních protilátek proti molekulám bakteriální stěny[31]. I když se z principiálního hlediska cytometrická měření fenotypových změn na *in vitro* modelech dají jen obtížně extrapolovat na organismus jako celek a pouze s výhradami mohou přispět k vysvětlení kauzality sledovaných jevů. Díky současným přístrojovým možnostem, jednoduchosti a časové nenáročnosti zpracování materiálu umožňující získat výsledky v horizontu desítek minut, mají jistě své velké opodstatnění při hledání pomocných diagnostických metod.

Z toho důvodu jsme na našem pracovišti ve spolupráci s Proteomovým centrem pro výzkum nitrobuněčného parazitismu (Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové) vyvinuli funkční *in vitro* model primární infekce myších buněk monocytomakrofágové linie J774.2 kmenem *Francisella tularensis* LVS. Naše analýzy byly zaměřeny zejména na vzájemnou interakci mezi *F.t.* LVS a hostitelskou buňkou v průběhu primární infekce. Dále na okolnosti související s přežíváním *F.t.* LVS v cytoplazmě makrofágů a na podmínky efektivní stimulace makrofágů vedoucí k eliminaci infekce.

Díky průtokově cytometrické analýze infikovaných makrofágů jsme se pokusili definovat charakteristické fenotypové změny makrofágů v průběhu infekce a stimulace. Tyto byly dále korelovány s produkcí oxidu dusnatého infikovanými či stimulovanými buňkami a se schopností bakterií přežít v experimentálních podmínkách. V následujícím textu jsou prezentovány stěžejní výsledky.

4. Cíle práce

Rozsáhlý výzkum imunobiologických vlastností infekce *F.t.* vedl v posledních desetiletích k enormnímu nárůstu informací o jejím průběhu a důsledcích. V současné době je však jen velmi málo informací o fenotypových změnách ve smyslu exprese povrchových molekul infikovaných makrofágů v prvních hodinách infekce. Rovněž je nejasný způsob indukce anergie a apoptózy u infikovaných buněk, kterou lze považovat za specifickou formu úniku imunitním mechanismům hostitele. Byly stanoveny následující cíle a pracovní otázky:

- 1) je možné *in vitro* vytvořit podmínky pro intracelulární přežívání *Francisella tularensis* LVS?
- 2) existují fenotypové změny hostitelských buněk, které by byly specifické pro průběh infekce?
- 3) je možné stimulací makrofágů eliminovat infekci?

- 4) je možné sledováním fenotypu v čase charakterizovat funkční stav hostitelské buňky a potažmo tak předpovídat osud infekce?
- 5) dochází k interakci mezi infekcí a chováním hostitelské buňky v průběhu stimulace? Pokud ano, jaká je její povaha?
- 6) existuje specifický fenotypový korelát interakce bakterie *Francisella tularensis* LVS s hostitelskou buňkou?
- 7) jsou uvedená zjištění klinicky aplikovatelná v konkrétní či alespoň obecné podobě?

5. Metodika

5.1. Použitý materiál

Myší monocyto-makrofágová buněčná linie J774.2 odvozená z BALB/C myší (ECACC, No. 85011428). *Francisella tularensis* LVS (ATCC 29684, American Type, Culture Collection, Manassas, Va.).

Kultivační médium pro myší buňky: Dulbecco's MEM (modified Eagle's medium) s obsahem glutamátu (Glutamax-1) (GIBCO, 31966021) s 10% FBS (fetální bovinní sérum - GIBCO). Kultivace buněk probíhala v kultivační lahvích 50ml, 25cm² (Techno plastic products). Gentamicin (Sigma-Aldrich Co., G1272 - roztok o koncentraci 10 mg/ml v deionizované vodě, sterilně filtrován, testován na buněčných kulturách), v koncentraci pro použití při kultivaci buněk 5 ml/l.

Kultivační plotny pro *Francisella tularensis* LVS: McLeodův agar připravovaný za sterilních podmínek v laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie FN HK, obsahující bovinní hemoglobin.

Lipopolysacharid z *E.coli* (055:B5, Sigma-Aldrich Co., L2880) a rekombinantní myší Interferon- γ (Sigma-Aldrich Co., I4777)

Monoklonální protilátky přímo konjugované s FITC a PE: CD86 (PE, Immunotech), CD54 (FITC, BD Pharmingen), CD16/32 (PE, BD Pharmingen).

Griessovo reagens (Sigma Aldrich, G4410) pro měření produkce NO.

Roztok fosfátového pufru PBS (NaCl 7,75g; K₂HPO₄ 1,50g; KH₂PO₄ 0,20g v 1 l dest. vody), propidium jodid (Sigma-Aldrich Co., 81845).

5.2. Přístrojové vybavení

Průtokový cytometr FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA, software Cell QuestTM ver. 3.3), imunofluorescenční mikroskop Zeiss Axioskope 2 plus (Carl Zeiss Vision

Gmbh, Hallbergmoos, Germany). ELISA reader MULTISKAN RC (Thermo Scientific), Laminární box Jouan, typ MSC.9 (Thermo Scientific), CO₂ inkubátor Heraeus (Thermo Scientific), centrifuga Allegra X-22 (Beckman-Coulter). Statistická analýza byla prováděna pomocí programů MedCalc (ver. 5.00.017) a SPSS Statistics (ver. 17.0).

5.3. Časový protokol pokusů

Všechny pokusy měly smíšený design, t.j. byly analyzovány jak parametry jednotlivých buněčných populací opakovaně v pravidelných časových intervalech (opakovaná měření, within subjects effects), tak nezávisle, t.j. na různých populacích při vytvoření odlišných podmínek (nezávislá měření, between subjects effects). Opakovaná měření byla prováděna v čase 0, dále v čase 3 hod., 6 hod., 9 hod., 12 hod. a 24 hod. V každém intervalu byly hodnoceny počty myších buněk, jejich životnost a přežívání bakterií, průtokově cytometrická analýza vybraných povrchových znaků myších buněk, fluorescenčně mikroskopická analýza pro optickou verifikaci a měření produkce NO v supernatantu.

Vzhledem k tomu, že v rámci nezávislých měření byl hodnocen efekt infekce a stimulace, byla navržena čtyři různá modelová schémata pro infekci a stimulaci. Jednak samotná stimulace neinfikovaných buněk, samotná infekce nestimulovaných buněk a dále infekce buněk po třech hodinách stimulace a nakonec stimulace buněk po třech hodinách kontaktu s infekcí. Čas 0 v případě smíšených pokusů byl stanoven vždy na okamžik, kdy byly v systému přítomny obě komponenty, tedy jak infekce, tak stimulace. Pro každou modelovou situaci byly vyhodnoceny minimálně tři pokusy, celkem bylo tedy provedeno 60 nezávislých pokusů. Statistické analýzy byly prováděny jak u celého souboru dat, tak separovaně na jednotlivých časových modelech pro ozřejmění specifických interakcí faktorů.

5.4. Kultivace, infekce a stimulace buněk

Buňky myší monocyto-makrofágové linie J774.2 byly 48 hod. před zahájením pokusu nasazovány do kultivačních lahví s kultivačním médiem Dulbecco's MEM s glutamátem a 10% fetálního bovinního séra bez gentamicinu. Koncentrace nasazovaných buněk do kultivační láhve byla 2×10^6 na 10 ml média. Buňky byly následně kultivovány 48 hod. v inkubátoru při 37°C v 5% atmosféře CO₂.

Po 48 hodinové kultivaci buněk v mediu bez gentamicinu byla přidána *F. tularensis* LVS kultivovaná 24 h při 36,6°C na McLeodově agaru. Počty bakterií byly stanovovány podle optických vlastností jejich suspenze ve fosfátovém pufru (PBS). Optická denzita byla odečítána při 550 nm (OD_{550nm}) pomocí ELISA readeru. Multiplicita infekce byla nastavena na 1:100.

Buněčná linie byla vystavena *F.tularensis* LVS v dané multiplicitě na 2 h při 37°C v 5% atmosféře CO₂ a následně resuspendována do média s gentamicinem na 1 h při 37°C v atmosféře 5% CO₂ a promyta médiem bez gentamicinu centrifugací (300g, 7 min). Takto připravené infikované buňky byly dále v průběhu pokusu kultivovány v médiu bez gentamicinu.

Pro stimulaci buněk (neinfikovaných nebo infikovaných - t.j. 3 hod. po prvním kontaktu s infekcí) byl použit lipopolysacharid *E.coli* v koncentraci 10 a 50 ng/ml média a rekombinantní myší interferon- γ v koncentraci 100 a 1000 IU/ml média. Stimulační agens byla přidávána buď izolovaně (samotný LPS či IFN γ) nebo v kombinacích (LPS 10 ng/ml média + IFN γ 100 IU/ml média a LPS 50 ng/ml média a IFN γ 1000 IU/ml média).

5.5. Životnost buněk a proliferace bakterií

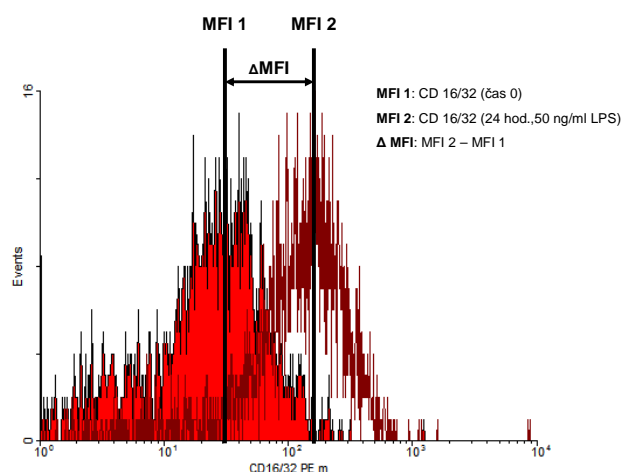
V jednotlivých intervalech byly hodnoceny počty a životnost myších buněk. Počty buněk byly ověřovány manuálně pomocí optické mikroskopie suspenze v Bürkerově komůrce, jejich životnost byla analyzována za pomoci barvení 0,5% roztokem trypanové modři a průtokově cytometricky pomocí barvení propidium iodidem (50 μ g/ml PBS).

Stejně tak bylo hodnoceno v každém intervalu i přežívání bakterií. Infikované buňky byly 1x promyty ve fosfátovém pufru a dále resuspendovány do 1ml fosfátového pufru. Vzorky o objemu 100 μ l byly vysety na McLeodův agar a následně 24 hod. kultivovány za standardních podmínek v 36,6°C. Poté byly počítány kolonie formující jednotky (CFU). Udávaná hodnota je dekadickým logaritmem počtu CFU (\log_{10} CFU/ml).

5.6. Průtokově cytometrická analýza

Příprava materiálu pro průtokově cytometrickou analýzu probíhala dle standardního postupu. Do sady zkumavek (dle počtu vyšetřovaných znaků a kombinací) bylo rozpipetováno 50 μ l suspenze buněk (1×10^6 buněk) ve fosfátovém pufru (PBS) a následně přidány monoklonální protilátky přímo konjugované s fluorescenčním barvivem (1 μ g/ 1×10^6 buněk). Protilátky byly inkubovány s buňkami po dobu 30 min. při teplotě 2-8°C. Nenavázané protilátky byly odstraněny promytím buněk v PBS a opakovanou centrifugací (200g, 3 min), celkem 3x. Připravený materiál byl následně analyzován průtokovým cytometrem, minimální počet analyzovaných buněk byl stanoven na 2000. Hodnocena byla průměrná intenzita fluorescence sledovaných buněk (MFI - mean fluorescence index) a její relativní změna ve srovnání s hodnotou v čase 0. Názorně viz. Obr.1.

Obr.1: Princip měření absolutní a relativní hodnoty MFI



5.7. Měření produkce NO v supernatantu

Stanovení oxidu dusnatého (NO) ve formě oxidačního produktu (dusitanů - NO₂⁻) v buněčných supernatantech bylo provedeno Griessovou metodou. Vzorky supernatantu buněk v jednotlivých časových intervalech byly nejprve deproteinizovány (centrifugací při 16 000g, 15 min) a následně inkubovány 30 minut s Griessovým reagens v poměru 1/1 (150 μl / 150 μl) při laboratorní teplotě na mikrotitrační destičce. Výsledná změna barvy, úměrná množství NO₂⁻ aniontů byla objektivizována spektrofotometricky, změnou absorbance světla o vlnové délce 550 nm (OD_{550nm}) pomocí ELISA readeru. Při každém pokusu byla zkonstruována kalibrační křivka (pomocí referenčních roztoků NaNO₂), umožňující výpočet koncentrace NO₂⁻ v materiálu v μM/l. Výsledná hodnota je udávána jako relativní vzestup ve srovnání s hodnotou v čase 0.

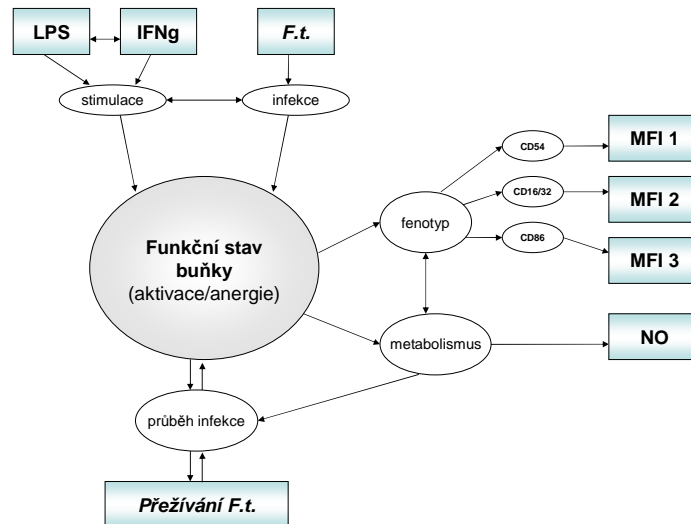
5.8. Statistické zpracování dat

Experimentální *in vitro* studie měla smíšený design. Data byla statisticky analyzována smíšenou faktoriální ANOVOU konceptualizovanou spolu s mnohočetnou regresí do obecného lineárního modelu (general linear model – GLM)[32]. Výsledkem jsou časové řady pro jednotlivé sledované parametry za konkrétních okolností spolu s vyjádřeními statistické významnosti efektů a standardizované síly efektu. Dále byly aplikovány postupy logistické regrese a ROC analýzy (receiver operating characteristics curve).

Pro zpřehlednění situace při statistické analýze byl vytvořen strukturální model vztahů jednotlivých proměnných (SEM – structural equation modelling). Na Obr. 2 jsou znázorněny nezávisle proměnné či prediktory (stimulace / infekce / vzájemný vztah vzhledem k časovému aspektu), latentní závisle proměnná (funkční stav buňky), tedy proměnná, kterou není možné

měřit přímo a je k tomu třeba využít jiné parametry (měřené proměnné), v našem případě fenotyp (reprezentovaný konkrétními hodnotami MFI jednotlivých znaků v čase) a metabolismus buňky (hodnocený podle aktivity produkce NO).

Obr.2: Strukturální model pro statistickou analýzu



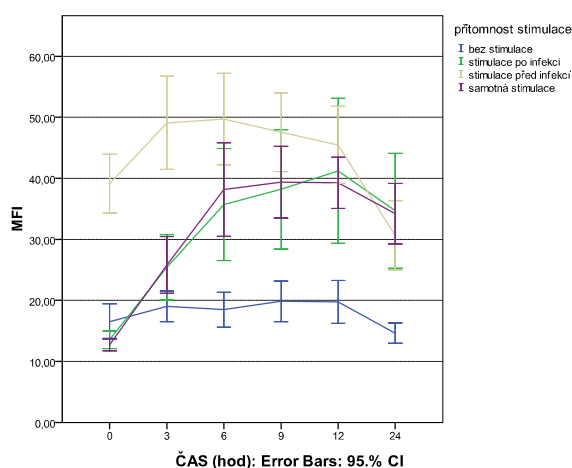
6. Souhrn výsledků

6.1. Fenotypové změny

6.1.1. Exprese CD54

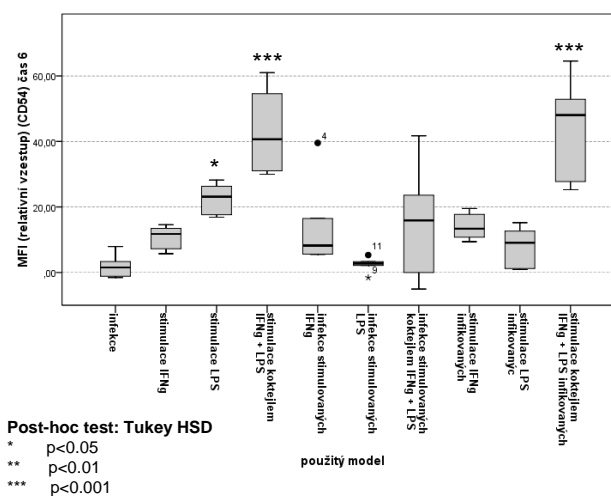
Molekula CD54 vykazuje vysoce signifikantní závislost exprese na čase bez ohledu na další faktory, $F(2,74; 153,23)=30,9$, $p<0.001$ (vzhledem k porušení podmínek sféricity dat, jsou výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera). Časové změny MFI CD54 jsou navíc signifikantně závislé na zvoleném časovém modelu pokusu (t.j. samotná infekce, samotná stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), $F(8,21; 153,23)=9,84$, $p<0.001$. Analýza kontrastů navíc prokázala, že nástup indukce exprese je velice rychlý a svého maxima zpravidla dosahuje již během šesti hodin (viz. Graf 1).

Graf 1: Absolutní hodnoty MFI pro CD54 v čase v závislosti na modelovém schématu



Lze tedy říci, že změny exprese CD54 jsou velmi rychlé a již po 6ti hodinách kontaktu se stimulačním agens dosahují téměř svého maxima, po 24 hod. již dochází k mírnému poklesu, který pravděpodobně souvisí s imunomodulačním efektem produkovaného NO. Cíleně byla proto dále hodnocena změna MFI po 6ti hodinách v závislosti na zvoleném časovém modelu a stimulačním agens. Výsledkem jsou vysoce signifikantní rozdíly $F(9; 59)=14,2$, $p<0,001$. Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolanou samotnou infekcí (negativní kontrola), lze tvrdit, že nejvýznamnější rozdíl je v případě samotné stimulace kombinací $IFN\gamma+LPS$ a stimulace kombinací $IFN\gamma+LPS$ předem infikovaných buněk (v obou případech je $p<0,001$, viz. Graf 2).

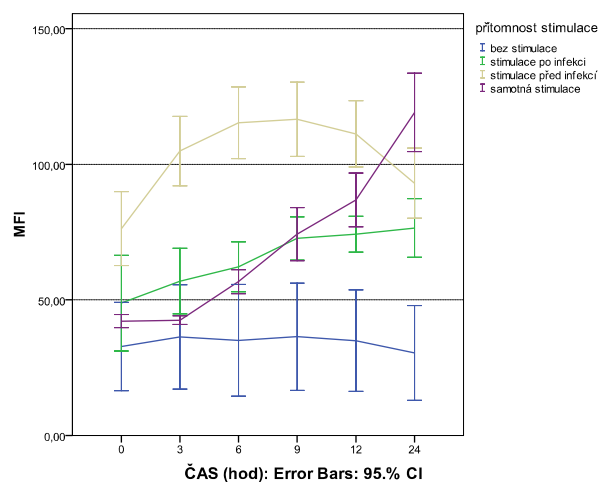
Graf 2: Relativní změny MFI CD54 po šesti hodinách



6.1.2. Expres CD16/32

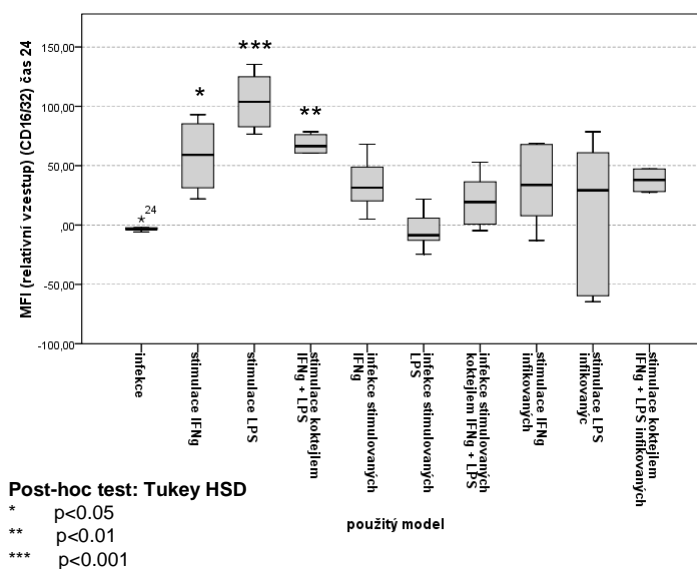
Expres CD16/32 byla analyzována stejným způsobem, jako CD54. I zde je přítomna vysoce signifikantní závislost na čase bez ohledu na další faktory, $F(2,13; 119,2)=32,9$, $p<0.001$. (Vzhledem k porušení podmínek sféricity dat, jsou i v případě CD16/32 všechny následující výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera). Časové změny MFI CD16/32 jsou signifikantně závislé i na zvoleném modelu stimulace a infekce (t.j. samotná infekce, samotná stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), $F(6,39; 119,2)=19,6$, $p<0.001$. Analýza kontrastů v případě jednoduchého efektu času prokázala, že při srovnání s referenční vstupní hodnotou jsou všechny následující signifikantně odlišné (jednoduchý kontrast) a závislost má lineární charakter (polynomiální kontrast). Nástup indukce exprese je ve srovnání s CD54 pomalejší a svého maxima zpravidla dosahuje po 24 hodinách stimulace (viz. Graf 3).

Graf 3: Absolutní hodnoty MFI pro CD16/32 v čase v závislosti na modelovém schématu



Změny exprese CD16/32 jsou poněkud pomalejší, než je tomu v případě CD54 a dosahují tak svého maxima zpravidla až po 24 hodinách kontaktu se stimulačním agens. Byla proto cíleně dále analyzována změna MFI po 24 hodinách v závislosti na zvoleném modelu stimulace a infekce a konkrétním stimulačním agens. Výsledkem jsou opět vysoce signifikantní rozdíly $F(9; 59)=8,7$, $p<0,001$. Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolaná samotnou infekcí (negativní kontrola), lze říci, že nejvýznamnější rozdíl je v případě samotné stimulace LPS, méně již při kombinaci $IFN\gamma$ +LPS či samotného $IFN\gamma$. Pokud však stimulace byla kombinována s infekcí, rozdíly v nárůstu nebyly signifikantní (viz. Graf 4).

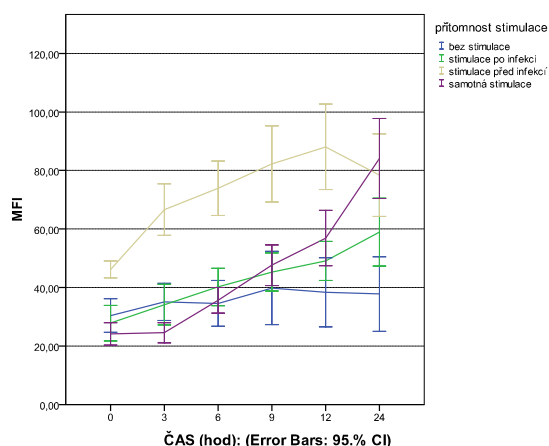
Graf 4: Relativní změny MFI CD16/32 po 24 hodinách



6.1.3. Expresse CD86

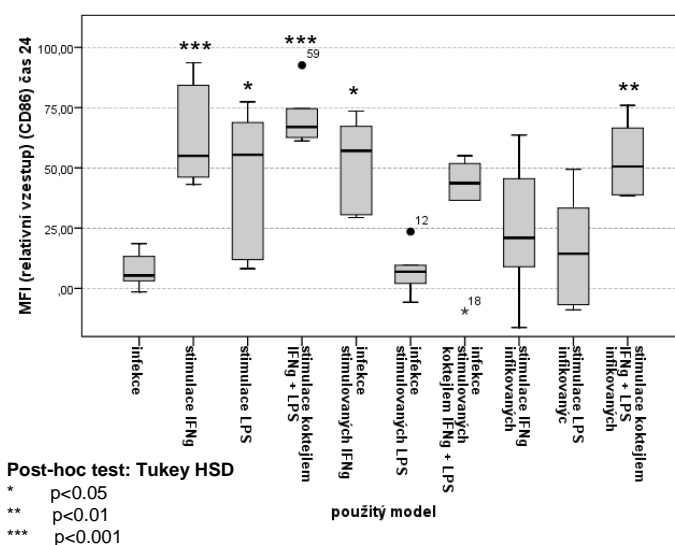
Stejně jako v případě CD54 a CD16/32 byla analyzována i exprese CD86. I v tomto případě je přítomna vysoce signifikantní závislost exprese na čase bez ohledu na další faktory, $F(2,46; 137,8)=51,5$, $p<0.001$ (stejně jako u předchozích znaků jsou u CD86 všechny výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera). Časové změny MFI CD86 jsou signifikantně závislé i na zvoleném modelu infekce a stimulace pokusu (t.j. samotná infekce, samotná stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), $F(7,39; 137,7)=10$, $p<0.001$. Analýza kontrastů u jednoduchého efektu času prokázala, že ve srovnání s referenční vstupní hodnotou jsou všechny následující signifikantně odlišné (jednoduchý kontrast) a stejně tak i každá následující hodnota ve srovnání s hodnotou předchozí (opakovaný kontrast). Závislost má lineární charakter (polynomiální kontrast). Nástup indukce exprese podobně jako u CD16/32 pomalejší a svého maxima zpravidla dosahuje po 24 hodinách stimulace (viz. Graf 5).

Graf 5: Absolutní hodnoty MFI pro CD86 v čase v závislosti na modelovém schématu



Změny exprese CD86 tedy zpravidla dosahují tak svého maxima až po 24 hodinách kontaktu se stimulačním agens. Proto byla analyzována změna MFI po 24 hodinách v závislosti na zvoleném časovém modelu a stimulačním agens. Výsledkem jsou i zde vysoce signifikantní rozdíly $F(9; 59)=7,7$, $p<0,001$. Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolaná samotnou infekcí (negativní kontrola), byl nejvýznamnější rozdíl v případě samotné stimulace $IFN\gamma$ a stimulace kombinací $IFN\gamma+LPS$, méně již při stimulaci samotným LPS. Významný rozdíl je i v případě stimulace infikovaných buněk koktejlem $LPS+IFN\gamma$.

Graf 6: Relativní změny MFI CD86 po 24 hodinách



6.1.4. Kombinace znaků

Pro komplexní zhodnocení změn všech znaků dohromady byl opět aplikován obecný lineární model s kořenovým testem - smíšená faktoriální ANOVA. Vzhledem k porušení požadavku sféricity dat je opět na všechny výsledky aplikována korekce epsilon dle Greenhouse a Geissera. Z velkého množství výsledků jsou vybrány pouze ty nejzajímavější.

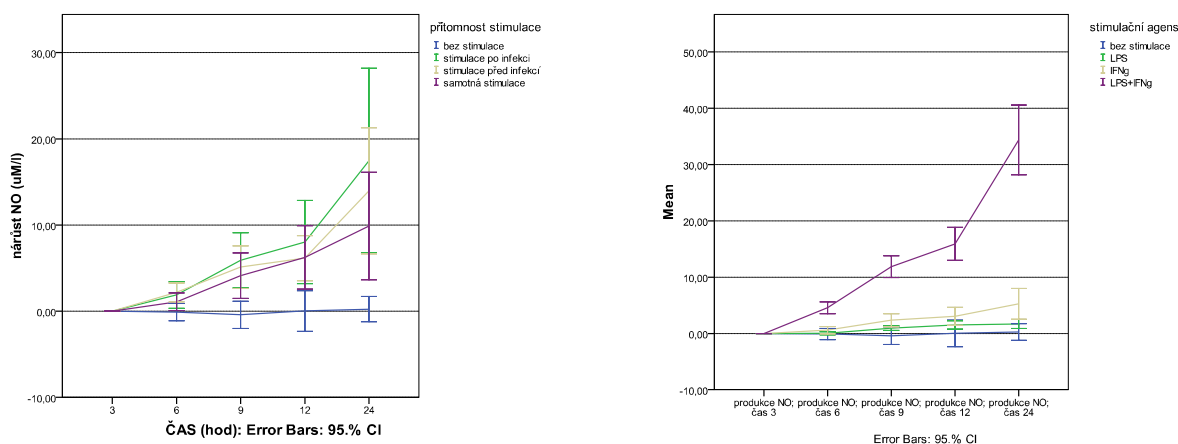
Na podkladě analýz je zřejmé, že všechny výše citované efekty (čas a modelové schéma pokusu) a jejich vzájemné interakce (které jsou z praktického hlediska nejdůležitější) vykazují vysoce signifikantní výsledky. Je velmi významný rozdíl v časovém průběhu exprese jednotlivých fenotypových znaků bez ohledu na další faktory $F(5,17; 258,5)=25,8$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,34$. V případě interakce fenotypu s časem a modelem stimulace resp. infekce je dosaženo podobně signifikantního výsledku $F(10,3; 128,5)=17,3$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,41$.

Z praktického hlediska byla nejzajímavější analýza kontrastů pro interakce všech hodnocených faktorů. Budeme-li hodnotit rozdíl v Δ MFI mezi znaky CD54 a CD16/32, pak u jednotlivých časových modelů a s použitím různých stimulátorů dochází k signifikantním rozdílům a to v hodinách 3, 6, 12 a nejvíce ve 24. hodině $F(4; 50)=5,03$, $p=0,002$. K velmi obdobně signifikantním rozdílům dochází v případě srovnání CD16/32 a CD86 s maximálním rozdílem ve 24. hodině $F(4; 50)=4,84$, $p=0,002$. Nejvýznamnější rozdíl časově závislého průběhu exprese v závislosti na vnějších podmínkách je mezi znaky CD54 a CD86, přičemž svého maxima dosahuje v šesté hodině $F(4; 50)=9,5$, $p<0,001$.

6.2. Produkce NO

Rozložení naměřených hodnot relativního nárůstu produkce NO ($\mu\text{M/l}$) mělo nenormální rozložení (významně pozitivní šikmost), které nebylo odstranitelné logaritmickou transformací dat a zároveň nebyla naplněna podmínka homoskedasticity ani sféricity. Při hodnocení jeho obecné závislosti na čase byl proto použit neparametrický Friedmanův test (pro závislé soubory), který prokázal vysoce signifikantní výsledek $\chi^2(5)=79,6$, $p<0.001$. Pro ozřejmění efektu jednotlivých stimulačních agens a časových modelů stimulace (vč. interakce) byla použita s výhradami (nenormální rozdělení souboru, nehomoskedasticita a porucha sféricity) smíšená faktoriální ANOVA. Výsledkem je statisticky velmi významný efekt obou faktorů (časový model $F(3,15; 78,73)=6,18$, $p=0,001$, partial $\eta^2=0,74$ a stimulační agens $F(3,15; 78,7)=123,5$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,83$) a jejich interakcí $F(6,3; 78,7)=5,57$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,31$ (viz. Graf 7).

Graf 7: Závislost produkce NO (uM/l) v závislosti na čase a přítomnosti infekce, resp. použitím stimulačním agens



Vzhledem k tomu, že z předchozí analýzy vyplývá, že produkce NO dosahuje svého maxima po 24 hodinách od počátku pokusu, zajímalo nás bližší rozlišení její závislosti na stimulačním agens i časovém modelu stimulace. Kruskal-Wallisův test vykazuje vysoce signifikantní výsledek $\chi^2(9)=46,3$, $p<0.001$. Následný test jednoduchého efektu podmínek pokusu (Tukey HSD) ukázal, že ve srovnání se samotnou infekcí jsou všechny případy, kdy byla do systému přidána kombinace LPS+IFN γ (jak samostatně, bez infekce, tak před či po infekci) velmi významně vyšší ($p<0.001$).

6.3. Praktické výstupy

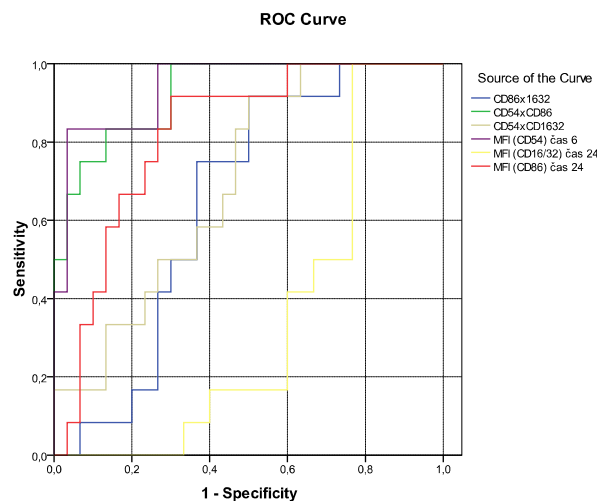
Výše uvedené výsledky je možno zobecnit minimálně ve dvou směrech. A) ve smyslu snahy o zodpovězení otázky ovlivnění chování hostitelských buněk infekcí a B) z hlediska definice fenotypových změn v rámci predikce eliminace infekce.

F.t. významně ovlivňuje chování infikovaných buněk, což je možné prokázat změnami v typickém průběhu jejich aktivace. K explicitnímu vyjádření uvedeného fenoménu byla vedena nezávislá faktoriální ANOVA počítající efekty přítomnosti infekce a stimulačního agens na hodnotu MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině. Díky výsledkům ANOVY je zřejmé, že daleko větší efekt na výsledné hodnoty sledovaných parametrů má zvolené stimulační agens (t.j. žádné, LPS, IFN γ či kombinace LPS+IFN γ) ve srovnání s efektem modelu infekce a stimulace (t.j. žádná infekce, infekce po stimulaci, infekce před stimulací či samotná infekce). Není bez zajímavosti, že není signifikantní efekt interakce mezi modelem infekce a zvoleným stimulačním agens, což je možné interpretovat tak, že není signifikantní rozdíl mezi účinkem jednotlivých stimulačních agens v příslušných modelech stimulace. Přesto je patrný trend v dosahování vyšších hodnot MFI (jak CD54 tak CD86)

v případě přidání infekce ke stimulovaným buňkám a naopak nižších v případě, že byly stimulovány již infikované buňky. Zároveň tyto parametry mají tendenci reagovat více na $IFN\gamma$ než na LPS a zdaleka nejvíce na jejich kombinaci (a to bez ohledu na zvolený model infekce). Samotná infekce indukuje pouze minimální změny fenotypu.

K zodpovězení otázky, zda konkrétní změny v expresi sledovaných povrchových znaků mohou sloužit k predikci průběhu infekce ve smyslu její eliminace byla v dalším kroku provedena ROC (receiver operating characteristics curve) analýza zaměřená na některé typické fenotypové nálezy (hodnoty MFI CD54 v 6. hodině, hodnoty MFI CD16/32 a CD86 ve 24. hodině a dále násobky MFI CD54 v 6. hodině x MFI CD86 resp. CD16/32 ve 24. hodině a konečně násobek CD86 a CD16/32, obojí ve 24. hodině). Výsledkem je ROC křivka s definovanou plochou pod křivkou (AUROC), signifikancí a jednotlivými koordinátami (viz. Graf 8).

Graf 8: ROC analýza



V tomto ohledu se jako nejužitečnější jeví parametry MFI CD54 v 6. hodině ($p < 0,001$) a součin MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině ($p < 0,001$), o něco méně samotné MFI CD86 ve 24. hodině ($p = 0,001$) a hraničně součin MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD16/32 ve 24. hodině ($p = 0,048$). Na podkladě vypočtených koordinát je možné tvrdit, že pokud byla u myších buněk v 6. hodině naměřena hodnota MFI pro CD54 větší než 37,9, pak bylo možné se 100% senzitivitou a 73,3% specifivitou tvrdit, že došlo následně ve 24. hodině k úplné eliminaci infekce. O něco méně senzitivní, ale zato specifičtější se v tomto směru jeví index vypočtený násobkem MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině. Pokud přesahoval

hodnotu 3057,5, pak předpovídal eliminaci infekce s 83% senzitivitou a 87% specificitou. Na podkladě získaných výsledků lze tedy usuzovat, že indukce exprese CD54 již v 6. hodině je senzitivnějším, nicméně méně specifickým parametrem. Jako takový má výsledek při nedosažení kritické hladiny vysokou negativní prediktivní hodnotu (100%), ale nižší pozitivní prediktivní hodnotu (60%). Oproti tomu součin MFI CD54 v 6. hodině a CD86 ve 24. hodině je méně senzitivní, ale podstatně více specifický marker eliminace infekce a jako takový má i vyšší pozitivní prediktivní hodnotu (70%) a nižší negativní prediktivní hodnotu (92%).

7. Odpovědi na otázky formulované v úvodu

- 1) V *in vitro* podmínkách je možné vytvořit model infekce intracelulárním parazitem *F.t.* LVS vhodný k studiu vzájemného vztahu mezi bakterií a hostitelem.
- 2) Infekce zásadním způsobem zasahuje do fyziologických mechanismů hostitelské buňky v průběhu její aktivace. Tento efekt je reprodukovatelný a vykazuje specifické fenotypové projevy, které jsou měřitelné v různých časových intervalech probíhající infekce
- 3) Prostřednictvím stimulace infikovaných makrofágů a to zejména kombinací LPS a $IFN\gamma$ je možné docílit eliminace infekce zpravidla již během 24 hodin. Tato kombinace obou stimulačních agens se jeví jako optimální forma aktivace nitrobuněčných signálních drah makrofágů vedoucí k infekci neovlivnitelné lýze patogenů.
- 4) Podařilo se stanovit velmi senzitivní a specifické fenotypové markery, pomocí jejichž měření je možné s vysokou pravděpodobností odhadnout průběh infekce.
- 5) Infekce makrofágů bakterií *F.t.* LVS vede k významnému ovlivnění jejich fyziologických funkcí, zejména ve smyslu redukce odpovědovosti na stimulaci. Tento jev se v souladu s aktuálními informacemi o imunopatogenezi onemocnění tularemie vysvětluje schopností invadující bakterie interferovat s nitrobuněčnými signálními drahami, zejm. $NF\kappa B$ a MAPK.
- 6) Samotná infekce nevyvolává významné fenotypové změny infikovaných buněk, nicméně svým komplexním imunomodulačním působením bránícím efektivní aktivaci makrofágů je její aktivita dobře prokazatelná a vizualizovatelná po přidání stimulačních agens.
- 7) Výsledky pokusů v *in vitro* systému jsou ve své konkrétní podobě jen nesnadno extrapolovatelné na organismus jako celek. Ve zjednodušených laboratorních podmínkách pochopitelně nejsou (a ani nemohou být) brány v potaz všechny matoucí proměnné, které by výsledek mohly významně ovlivnit. Přesto však podobné funkční modely dávají nahlédnout k samotné podstatě komplikované interakce mezi infekcí a hostitelem alespoň v principiální podobě. Dokáží tak nasměrovat další výzkum k analýze komplexnějších

modelových situací. Přinášejí zároveň důležité informace o faktorech virulence, které jsou pak předmětem dalšího výzkumu, zejména vakcinologického. V neposlední řadě je třeba zmínit, že model aktivovaných makrofágů je univerzálním nástrojem pro výzkum v daleko širších souvislostech, než pouze při studiu infekcí jako takových. Poskytuje užitečný substrát pro studie imuno-toxikologické či alergologické.

8. Diskuze

Díky poměrně bohatému písemnictví je v současné době k dispozici mnoho informací o průběhu primární infekce *F.t.* a o osudu infikovaných makrofágů. Přesto nadále zůstává velké množství nezodpovězených otázek, které se týkají jak faktorů patogenity na straně bakterie, tak protektivních mechanismů na straně hostitelské buňky.

Z principiálního hlediska se cytometrická měření fenotypových změn na *in vitro* modelech dají jen obtížně extrapolovat na organismus jako celek a pouze s výhradami mohou přispět k vysvětlení kauzality sledovaných jevů. Avšak díky současným přístrojovým možnostem, jednoduchosti a časové nenáročnosti zpracování materiálu umožňující získat výsledky v horizontu desítek minut, mají jistě své velké opodstatnění při hledání pomocných diagnostických metod. Není bez zajímavosti, že měření exprese řady povrchových markerů již našlo alespoň v experimentálních studiích své místo při monitoraci zánětlivé aktivity buněk monocyto-makrofágové vývojové linie a to zejména u pacientů se systémovou zánětlivou odpovědí (SIRS) bakteriální etiologie[33].

Již několik minut po kontaktu *F.t.* s makrofágem dochází k její internalizaci[34] a v horizontu řádově několika hodin i k úniku z fagozómu za ne zcela jasných okolností[35]. Zhruba paralelně s tímto jevem (30 min. až jedna hodina) se začínají projevovat první účinky ve smyslu interference s nitrobuněčnou signalizací[36], rezultující ve změněné chování infikované buňky za klidových podmínek, ale zejména při její stimulaci[37]. Během 24-48 hodin *F.t.* indukuje v infikovaných buňkách cytopatické změny kompatibilní s apoptózou[38-41]. Předpokládá se, že jak interference s nitrobuněčnou signalizací, tak indukce apoptózy je jakýmsi „Trojským koněm“ invadující bakterie, umožňujícím její nerušenou proliferaci v cytoplazmě hostitelské buňky a další šíření do okolí bez indukce zánětlivých změn.

Výsledný obraz infekce však samozřejmě souvisí se souběžnou reakcí hostitelova imunitního systému a to jak ve smyslu samotných makrofágů, které poskytují infekci první útočiště a tvoří v organismu její rezervoár, tak imunitního systému jako celku (cytokinová produkce vedoucí k imunomodulaci, změnám ve vyžívání Th0 lymfocytů a následné reakci ostatních buněk imunitního systému, včetně makrofágů)[42-47].

V našich pozorováních výše zmíněným efektům infekce dobře odpovídají jak změny produkce NO, tak odlišné hodnoty MFI v čase pro jednotlivé povrchové molekuly měřené průtokově cytometricky v případě samotné infekce, infekce buněk předem stimulovaných, po přidání stimulačních agens do systému infikovaných buněk či v případě samotné stimulace makrofágů. Nálezby byly natolik výrazné, že jsme se pokusili prokázat statistickou souvislost mezi nárůstem exprese těchto markerů a eliminací infekce. Uvedená analýza prokázala, že použití této techniky a časově nenáročné metody analýzy infikovaných buněk je vhodným způsobem detekce efektivně aktivovaných buněk, které jsou schopny v následujících 24 hodinách eliminovat infekci, což bylo doprovázeno poklesem hodnoty $\log_{10}\text{CFU/ml}$ a tedy počtů živých bakterií v infikovaných buňkách.

Fenotypová analýza byla stěžejním momentem této práce s *in vitro* modelem infekce *F.t.*, a přinesla řadu nových informací o komplexní povaze vzájemného vztahu utvářeného mezi bakterií a hostitelskou buňkou. Funkční změny infikovaných buněk svými projevy však dalece přesahují pouze odlišnou aktivaci konkrétních genů a transkripci jimi kódovaných proteinů. Jsou vyjádřeny jak změněnou denzitou některých proteinů na buněčném povrchu, produkcí informačních molekul a s tím spojeným narušením regulace imunitního systému jako celku. Je tudíž zřejmé, že simplifikované podmínky *in vitro* bez matoucích proměnných nemůže uceleně postihnout fenomén infekce ve své celistvosti, ale pouze jeho velmi úzké výseky. I ty však mohou přinést důležitá fakta do mozaiky současného poznání.

9. Závěr

Cílem práce bylo vytvořit biologický model vhodný ke studiu interakce mezi hostitelskou buňkou a intracelulárním parazitem, *F.t.* LVS. Na podkladě provedených měření a analýz se domnívám, že uvedený model přináší řadu důležitých informací o podstatě vzájemného vztahu mezi eukaryotní a prokaryotní buňkou, o fenoménu intracelulárního parazitismu a principech jeho regulace. Každý poznatek je však potřeba vnímat pouze v těch souvislostech, v jakých byl získán a nemělo by docházet k zevšeobecnování skutečností, které nemají atributy kauzality, tak jak je chápali ve svých myšlenkách již v 18. století David Hume či John Stuart Mills. Trefnou parafrází by mohl být citát Williama Butlera Yeatse: „Přemýšlej jako moudrý člověk, ale mluv jazykem lidí“.

10. Použitá literatura:

- [1] Borio L, Inglesby T, Peters CJ, et al. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* 2002 May 8;287(18):2391-405.
- [2] Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001 Jun 6;285(21):2763-73.
- [3] Salem H. Issues in chemical and biological terrorism. *Int J Toxicol* 2003 Nov;22(6):465-71.
- [4] Sandstrom G. The tularaemia vaccine. *J Chem Technol Biotechnol* 1994 Apr;59(4):315-20.
- [5] Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005 May;87(4):277-81.
- [6] Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, Godbole S, et al. Complete genomic characterization of a pathogenic A.II strain of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *PLoS ONE* 2007;2(9):e947.
- [7] La SB, Elkarkouri K, Li W, et al. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res* 2008 May;18(5):742-50.
- [8] Titball RW, Petrosino JF. *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1105:98-121.
- [9] Waldo RH, Cummings ED, Sarva ST, et al. Proteome cataloging and relative quantification of *Francisella tularensis* *tularensis* strain Schu4 in 2D PAGE using preparative isoelectric focusing. *J Proteome Res* 2007 Sep;6(9):3484-90.
- [10] Pavkova I, Hubalek M, Zechovska J, Lenco J, Stulik J. *Francisella tularensis* live vaccine strain: proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction. *Proteomics* 2005 Jun;5(9):2460-7.
- [11] Hubalek M, Hernychova L, Havlasova J, et al. Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003 Apr 5;787(1):149-77.
- [12] Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. *Curr Opin Microbiol* 2003 Feb;6(1):66-71.
- [13] Barker JR, Klose KE. Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1105:138-59.
- [14] Qin A, Scott DW, Thompson JA, Mann BJ. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect Immun* 2009 Jan;77(1):152-61.
- [15] Woolard MD, Frelinger JA. Outsmarting the host: bacteria modulating the immune response. *Immunol Res* 2008;41(3):188-202.

- [16] Cole LE, Elkins KL, Michalek SM, et al. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J Immunol* 2006 Jun 1;176(11):6888-99.
- [17] Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* 2003 Feb;5(2):135-42.
- [18] Fuller CL, Brittingham KC, Hepburn MJ, et al. Dominance of human innate immune responses in primary *Francisella tularensis* live vaccine strain vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2006 May;117(5):1186-8.
- [19] Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun* 2009 May;77(5):1757-73.
- [20] Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, Ernst RK, Telepnev M, Sjostedt A. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *J Med Microbiol* 2004 Oct;53(Pt 10):953-8.
- [21] Santic M, Molmeret M, Klose KE, Abu KY. *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol* 2006 Jan;14(1):37-44.
- [22] Woolard MD, Wilson JE, Hensley LL, et al. *Francisella tularensis*-infected macrophages release prostaglandin E2 that blocks T cell proliferation and promotes a Th2-like response. *J Immunol* 2007 Feb 15;178(4):2065-74.
- [23] Wilson JE, Katkere B, Drake JR. *Francisella tularensis* induces ubiquitin-dependent major histocompatibility complex class II degradation in activated macrophages. *Infect Immun* 2009 Nov;77(11):4953-65.
- [24] Woolard MD, Hensley LL, Kawula TH, Frelinger JA. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect Immun* 2008 Jun;76(6):2651-9.
- [25] Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 2003 Jan;69(1):600-6.
- [26] Perroud TD, Kaiser JN, Sy JC, et al. Microfluidic-based cell sorting of *Francisella tularensis* infected macrophages using optical forces. *Anal Chem* 2008 Aug 15;80(16):6365-72.
- [27] De PR, Taylor BC, Elkins KL. Diverse myeloid and lymphoid cell subpopulations produce gamma interferon during early innate immune responses to *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* 2008 Sep;76(9):4311-21.
- [28] Hall JD, Woolard MD, Gunn BM, et al. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun* 2008 Dec;76(12):5843-52.

- [29] Chen W, Kuolee R, Austin JW, Shen H, Che Y, Conlan JW. Low dose aerosol infection of mice with virulent type A *Francisella tularensis* induces severe thymus atrophy and CD4⁺CD8⁺ thymocyte depletion. *Microb Pathog* 2005 Nov;39(5-6):189-96.
- [30] Ericsson M, Kroca M, Johansson T, Sjostedt A, Tarnvik A. Long-lasting recall response of CD4⁺ and CD8⁺ alphabeta T cells, but not gammadelta T cells, to heat shock proteins of *Francisella tularensis*. *Scand J Infect Dis* 2001;33(2):145-52.
- [31] Porsch-Ozcurumez M, Kischel N, Priebe H, Splettstosser W, Finke EJ, Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004 Nov;11(6):1008-15.
- [32] Field A. *Discovering statistics using SPSS*. Third ed. London: SAGE Publications Ltd., 2009.
- [33] van GM, Probst C, Muller K, Hoevel P, Pape HC. Leukocyte-endothelial interactions via ICAM-1 are detrimental in polymicrobial sepsis. *Shock* 2006 Mar;25(3):254-9.
- [34] Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 2005 Sep;73(9):5892-902.
- [35] Clemens DL, Horwitz MA. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1105:160-86.
- [36] Telepnev M, Golovliov I, Grundstrom T, Tarnvik A, Sjostedt A. *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol* 2003 Jan;5(1):41-51.
- [37] Telepnev M, Golovliov I, Sjostedt A. *Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Pathog* 2005 May;38(5-6):239-47.
- [38] Santic M, Pavokovic G, Jones S, Asare R, Kwaik YA. Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*. *Microbes Infect* 2009 Nov 16.
- [39] Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 2001 Jul;69(7):4691-4.
- [40] Lai XH, Sjostedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun* 2003 Aug;71(8):4642-6.
- [41] Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 2004 Nov;37(5):225-30.

- [42] Abplanalp AL, Morris IR, Parida BK, Teale JM, Berton MT. TLR-Dependent Control of *Francisella tularensis* Infection and Host Inflammatory Responses. *PLoS One* 2009;4(11):e7920.
- [43] Ashtekar AR, Zhang P, Katz J, et al. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol* 2008 Dec;84(6):1434-46.
- [44] Duenas AI, Aceves M, Orduna A, Diaz R, Sanchez CM, Garcia-Rodriguez C. *Francisella tularensis* LPS induces the production of cytokines in human monocytes and signals via Toll-like receptor 4 with much lower potency than *E. coli* LPS. *Int Immunol* 2006 May;18(5):785-95.
- [45] Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1105:284-324.
- [46] Henry T, Monack DM. Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cell Microbiol* 2007 Nov;9(11):2543-51.
- [47] Metzger DW, Bakshi CS, Kirimanjeswara G. Mucosal immunopathogenesis of *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1105:266-83.

11. Přehled publikační činnosti autora

Původní práce v časopisech s IF:

Loudová M., **Novosad J.**: Rapid test for the early detection of mycoplasma contamination of the continuous cell line J774.2. *Immunology Letters* 2004;92:215-216 (IF: 2,858; 5 year IF: 2,409)

Holická M., **Novosad J.**, Kudlova M., Loudova M., Andrys C., Krejsek J.: J774 macrophage-like cell line cytokine and chemokine patterns are modulated by Francisella tularensis LVS strain infection. *Folia Microbiol.* 2010; 55(2). (IF=1.172). Přijato k publikaci.

Původní práce v recenzovaných časopisech:

Novosad J., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Phenotype profile of effectively activated macrophage J774.2 cells. *Vojenské zdravotnické listy* 2004;vol 73(suppl.1):1-5.

Holícká M., **Novosad J.**, Loudová M., Andrýs C., Krejsek J.: Effect of IFN gamma, LPS and *Francisella tularensis* LVS infection on production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774.2 *in vitro*. *Vojenské zdravotnické listy* 2004;vol 73(suppl 1):5-7.

Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O, Voglova J, Škrabková Z, **Novosad J.**: The multidrug resistance and apoptosis evaluation in acute myeloid leukemia cells after the in vitro doxorubicin treatment. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2004;47(3):181-5.

Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O, Voglová J, **Novosad J.**: Sledování vybraných znaků mnohočetné rezistence k cytostatikům u leukemických buněk pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukémie. *Cas Lek Cesk.* 2004;143(7):471-5.

Novosad J., Kudlová M., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů in vitro. *Alergie*, 2006;3:233-237.

Holícká M., **Novosad J.**, Loudová M., Kudlová M., Krejsek J.: The effect of interferon- γ and lipopolysaccharide on the growth of *Francisella tularensis* LVS in murine macrophage-like cell line J774. *Acta Medica* 2009; 52(3):101-106.

Novosad J., Krčmová I., Kleiberová M., Králíčková P.: Principy měření oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu, srovnání dvou přístrojů pro elektrochemickou analýzu. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2009; 6(4):13-18.

Přehledové práce v recenzovaných časopisech:

Novosad J., Kodydková K., Krejsek J.: Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. II. Poruchy regulace apoptózy a jejich souvislost s rozvojem onemocnění. *Vnitr Lek.* 2001 Jun;47(6):387-90.

Novosad J., Kodydková K., Krejsek J.: Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. I. Definice apoptózy a její průběh na buněčné úrovni. *Vnitr Lek.* 2001 Jun;47(6):381-6.

Novosad J., Jankovičová K., Krejsek J.: Protein Bcl-2 a jeho úloha v maligní transformaci buňky. *Klinická onkologie*. 2002, 15(1): 2-6.

Novosad J., Fiala Z., Borská L., Krejsek J.: Immunosuppressive effect of polycyclic aromatic hydrocarbons by induction of apoptosis of pre-B lymphocytes of bone marrow. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2002;45(4):123-8.

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O.: Protilátková odpověď závislá a nezávislá na T lymfocytech. *Alergie* 2003;3:204-205.

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O.: Společenství mikroorganismů a člověka. *Alergie* 2003;3:206-210.

Hrudková M., Fiala Z., Borská L., **Novosad J.**, Smolej L.: Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na kostní dřeň. *Acta Medica Suppl* 2004;47(2):75-81.

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O. Imunopatogeneze diabetu mellitu I. typu. *Vnitr Lek*. 2004;50(5):408-11.

Krejsek J., Kuneš P., Andrys C., Holická M., **Novosad J.**, Kudlová M., Koláčková M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy. I. část: Přirozená imunita, rozlišení signálů nebezpečí. *Čas Lék Čes* 2005; 144:785-789.

Krejsek J., Kuneš P., Andrys C., Holická M., **Novosad J.**, Kudlová M., Koláčková M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy. II. část: receptory TLR, význam polymorfizmu receptorů pro nebezpečné vzory. *Čas Lék Čes* 2005; 144:790-794.

Krejsek J., Kudlová M., Koláčková M., **Novosad J.**: Imunita na sliznicích se zřetelem na sliznici urogenitálního traktu a diabetes. *Vnitr Lek*. 2008; 54(5):478-81.

Krčmová I., **Novosad J.**, Chládková I.: Měření nazálního NO - přínos pro klinickou praxi? *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2009; 6(4): 25-27.

Krčmová I., **Novosad J.**: Bronchiální astma – praktické aspekty. *Interní medicína pro praxi* 2010; 12(3): 48-51.

Novosad J., Holická M., Novosadová M., Krčmová I., Malá E., Krejsek J.: Imunopatogeneze infekce *Francisella tularensis* a rizika bioterorismu. *Alergie* 2010 – přijato do tisku.

Práce v časopisech bez recenzního řízení:

Novosad J.: Zánět a nádorové bujení. *Sanquis*, 2007;49:36-38.

Abstrakta:

Loudová M., Holická M., **Novosad J.**: Phenotypic and morphological changes in J774.2 cell line during *in vitro* infection of *Francisella tularensis*. Fourth international conference on tularemia. City of Bath, UK, 15.-18. 9. 2003.

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O.: Imunopatogenese autoimunitních onemocnění. Compendium patologie a léčby chorob pojiva. Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha, 2004:31-35. Soubor přednášek IX. Konference o patologii a léčbě chorob pojiva, Praha, 25. 4. 2003.

Novosad J., Holická M., Loudová M.: FcgIII/IIR (CD16/32)- a promising marker for monitoring of J774.2 macrophages stimulation? 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003.

Loudová M., **Novosad J.**, Holická M.: Phenotype analysis of J774.2 macrophages during stimulation. 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003.

Holická M., Loudová M., **Novosad J.**: Cell viability and nitric oxide production by J774.2 macrophages during stimulation. 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003.

Loudová M., **Novosad J.**, Holická M.: Efekt *in vitro* infekce *Francisella tularensis* LVS na stimulaci monocyto-makrofágové linie J774.2 pomocí LPS a IFN γ . V. dny průtokové cytometrie, Nemocnice Na Homolce, Praha, 19. – 20. 4. 2004.

Holická M., **Novosad J.**, Loudová M., Andrys C., Krejsek J.: Effect of IFN gamma, LPS and *Francisella tularensis* LVS infection on production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774.2 *in vitro*. Discussion forum 2004, Molecular and evolutionary aspects of host - pathogen interactions. Tři Studně, 26.-29.4.2004.

Krejsek J., Holická M., **Novosad J.**, Loudová M., Kudlová M., Andrys C.: Influence of simultaneous stimulation by LPS and Interferon gamma and *Francisella tularensis* infection on production of IL-6, IL-10, IL-12 and TNF alpha by macrophage J774 cells. 3rd International conference on Innate Immunity, Crete Greece, October 10-15, 2004.

Krocova Z., Stulik J., Andelova H., Hartmanova B., Hernychova L., Hubalek M., Lenco J., Brychta M., Holicka M., Loudova M., **Novosad J.**, Hrstka R., Macela A.: Interaction of *Francisella tularensis* with Eukaryotic Cells. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July 18-23, 2004.

Červinka M., Krejsek J., Rudolf E., Andělová H., Holická M., **Novosad J.**, Loudová M., Kudlová M.: Proteome centre for the study of intracellular parasitism. In Acta Medica (Hradec Králové), 2005, 48(2), 102.

Kudlová M., Holická M., **Novosad J.**, Krejsek J.: *In vitro* infekce myší monocyto-makrofágové linie J774.2 patogenní bakterií *F. tularensis* LVS a její experimentální ovlivnění ve smyslu efektivní eliminace infekce. XXIII. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XI. kongres českých a slovenských imunologů, Hradec Králové, 25.-28.10.2006.

Smolej L., Andrýs C., Vroblová V., **Novosad J.**, Belada D., Žák P., Krejsek J., Hrudková M., Široký O., Malý J.: Association of ZAP-70 expression with plasma levels of angiogenic activators in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 2007 92, Suppl. 1:353-353 (IF: 5,978, 5 year IF: 5,513)

Smolej L., Andrýs C., Vroblová V., **Novosad J.**, Krejsek j.: Relationship of ZAP-70 expression and circulating angiogenic cytokines in chronic lymphocytic leukaemia *British Journal of Haematology*, 2007, 137, č. Suppl. 1:59-59 (IF:4,478, 5 year IF: 4,248)

Novosad J., Loudová M., Holická M., Kudlová M., Krejsek J, Krčmová I.: Functional model of *in vitro* infection of murine macrophages by *F. tularensis* LVS. *World Allergy Organisation Journal* 2007; (Suppl. 11): S116

Krčmová I., Andrýs C., Drahošová M., **Novosad J.**: Two different application forms of grass pollen immunotherapy – the changes in the levels of cytokines IL-4 and IFN γ after 36 months of immunotherapy. *World Allergy Organisation Journal* 2007; (Suppl. 11): S239.

Novosad J., Novosadová M., Holická M., Krejsek J., Krčmová I.: Phenotype changes during activation of infected macrophage J774.2 cells. *Allergy* 2009; 64 (Suppl. 90): 265 (IF: 6,204; 5 year IF: 5,553).

Krčmová I., **Novosad J.**, Kralickova P., Kleiberova M., Chládkova J., Melicharova J.: Asthma control test, FeNO, functional parameters. *Allergy* 2009; 64 (Suppl. 90): 301-302 (IF: 6,204; 5 year IF: 5,553).

Krčmová I., Paráková Z., Sedlák V., **Novosad J.**: Jak Xolair ovlivňuje kvalitu života astmatiků? XV. Kongres ČPFS a SPFS, Praha, Česká republika, 25. - 28. 6. 2009.

Krčmová I., **Novosad J.**, Králíčková P., Kleiberová M., Malá E., Burešová E., Horynová E.: Comparative study of two devices for FeNO analysis (NIOX MINO and HypAir FeNO). XXI. WAC 2009, Buenos Aires, Argentina, 6.-10.12.2009.

Novosad J., Malá E., Holická M., Novosadová M., Krčmová I., Krejsek J.: Stimulation of macrophages by INF γ in combination with LPS leads to effective elimination of *F. tularensis* experimental infection. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010), Copenhagen, Denmark, 17 - 23 July 2010.

Novosad J., Novosadová M, Holická M., Malá E., Krčmová I., Krejsek J.: ICAM-1 expression on macrophages infected by *Francisella tularensis* LVS is a usefull predictor of an effective infection elimination. EAACI 2010, London, United Kingdom, 5.-9.6.2010.

Salajka F., Bartoš V., Šťásek J., Bis J., Brtko M., Polanský P., **Novosad J.**: Možnosti neinvazivního stanovení plicní hypertenze u nemocných s plicní fibrózou. Kongres ČPFS v Bratislavě 2010.

Bartoš V., Salajka F., Šťásek J., Bis J., Brtko M., Polanský P., **Novosad J.**: Lze stanovit plicní hypertenzi u pacientů s plicními fibrózami pomocí funkčního vyšetření plic? Naše zkušenosti. Hradecké pneumologické dny, Hradec Králové 2010.

Přednášky přednesené autorem:

Novosad J., Fiala Z., Borská L., Krejsek J.: Immunosuppressive effect of polycyclic aromatic hydrocarbons by induction of apoptosis of pre-B lymphocytes of bone marrow. 14th Congress of Pathological and Clinical Physiology, Hradec Králové, 18.9.2002

Novosad J., Holická M., Loudová M.: Effect of *Francisella tularensis* LVS *In Vitro* infection on Stimulation of J774.2 Cell Line by LPS and IFN γ . Výroční zasedání Ústavu molekulární patologie, Jablonné v Orlických Horách, 27.-28. 11. 2003

Novosad J., Loudová M., Holická M., Kudlová M.: průtokově cytometrická analýza patogeneze infekce *F. tularensis*. Výroční zasedání Ústavu molekulární patologie FVZ UO Hradec Králové, Malá Úpa, 2.-3.12.2004

Novosad J., Loudová M., Holická M.: Fenotypové změny myší monocyto-akrofágové linie J774.2 v souvislosti s in vitro infekcí *Francisella tularensis* LVS a stimulací LPS a IFN- γ . V. dny průtokové cytometrie, Nemocnice Na Homolce, Praha, 19. – 20. 4. 2004

Novosad J., Loudová M., Holická M.: Phenotype profile of effectively activated J774.2 cells. Discussion forum 2004, Molecular and evolutionary aspects of host - pathogen interactions. Tři Studně, 26.-29.4.2004

Novosad J., Kudlová M., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů in vitro. XI. Rožnovské alergo-imunologické dny, Rožnov pod Radhoštěm, 19.-20.5.2006

Novosad J.: Imunobiologie infekce HPV. XVI. konference sekce gynekologické endoskopie ČLS JEP, Hradec Králové 20. 9. 2007

Novosad J., Krčmová I.: Alergická rýma a její terapie intranasálními steroidy. XII. Hradecké pneumologické dny, Hradec Králové, 25. - 26. 4. 2008

Novosad J., Krčmová I.: Alergický zánět horních a dolních cest dýchacích. Odborný seminář „Dýchat volně - i nosem“, Hradec Králové, 7. 10. 2008

Novosad J., Krčmová I., Burešová E., Kleiberová M., Králíčková P., Horynová E, Malá E., Andrýs C.: Měření NO ve vydechaném vzduchu s pomocí přístrojů NIOX MINO a HypAir FENO - srovnávací studie. SSAKI 2009, Žilina, Slovenská republika, 14.-17. 10. 2009