

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Změny v expresi genů B buněčné linie Ramos RA-1 po infekci *Francisella tularensis*

Vedoucí diplomové práce: pplk. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.

Garant diplomové práce : Mgr. Klára Konečná

2011

Simona Matyášová



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, <http://www.faf.cuni.cz>
tel. +420495067111, fax +420495518002

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: **biologických a lékařských věd** Na akademický rok: 2010/2011

Jméno příjmení: **SIMONA MATYÁŠOVÁ**

Studijní program: **Farmacie**

Vedoucí diplomové práce: **mjr. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.**

Garant diplomové práce z KBLV: **MGR. Klára Konečná**

Název diplomové práce:

Změny v expresi genů B buněčné linie Ramos RA-1 po infekci Francisella tularensis

Název diplomové práce v angličtině:

Changes in gene expression of B cell line Ramos RA-1 after infection with Francisella tularensis

Zásady pro vypracování:

in vitro model: lidská B buněčná linie Ramos RA-1 (ATTC number: CRL-1596)

stimulace: živé a formaldehydovými parami usmrcené bakterie Francisella tularensis FSC200 a lipopolysacharid z E. coli

metoda: RT-PCR

primery: vybrané primery pro geny kódující cytokiny

princip:

- **stimulace buněk Ramos RA-1 LPS (pozitivní kontrola aktivace) a infekce buněk živými a usmrcenými bakteriemi**
- **v různých časových intervalech izolace RNA**
- **reverzní transkripce**
- **standardizace množství cDNA na "house keeping" geny a detekce exprese zkoumaných genů**

Seznam odborné literatury:

práce musí citovat minimálně 20 relevantních informačních zdrojů


literatura u školitele specialisty - nejméně 25 zdrojů (článků), které se týkají patogena *Francisella tularensis*, dále pak exprese cytokinových genů B buněk a metodiky RT-PCR.

Datum zadání diplomové práce: 25.1.2010

Termín odevzdání diplomové práce: 30. 4. 2011


PharmDr. Petr Jílek, CSc.

vedoucí katedry


Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

děkan fakulty

V Hradci Králové dne: 25.1.2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Simona Matyášová

.....

.....

Děkuji svým školitelům pplk. RNDr. Zuzaně Kročové a Mgr. Kláře Konečné za vedení diplomové práce a za odbornou pomoc, rady a podněty, které mi poskytovaly při jejím zpracovávání.

Obsah

1	ÚVOD A CÍL.....	- 8 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1	<i>Francisella tularensis</i>	- 9 -
2.1.1	<i>F. tularensis</i> – patogen	- 9 -
2.1.2	<i>F. tularensis</i> – faktory virulence	- 9 -
2.1.3	<i>F. tularensis</i> – původce tularemie.....	- 11 -
2.1.4	Tularemie – dostupné údaje o léčbě	- 12 -
2.1.5	<i>F. tularensis</i> – imunita	- 13 -
2.2	Interakce <i>F. tularensis</i> s hostitelskými buňkami.....	- 15 -
2.2.1	Interakce s makrofágy	- 15 -
2.2.1.1	IglC.....	- 17 -
2.2.2	Interakce <i>F. tularensis</i> s B buňkami, časná imunitní odpověď	- 18 -
2.2.3	Přímá interakce <i>F. tularensis</i> s B buňkami	- 18 -
2.3	PCR s reverzní transkripcí.....	- 21 -
2.3.1	Optimalizace PCR.....	- 22 -
2.3.2	Detekce ampliconů na gelu.....	- 23 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 25 -
3.1	Seznam použitého materiálu	- 25 -
3.1.1	Buněčné linie a bakterie	- 25 -
3.1.2	Primery pro RT-PCR.....	- 25 -
3.1.3	Média, roztoky a chemikálie.....	- 26 -
3.1.4	Přístroje a pomůcky v laboratoři	- 27 -
3.1.5	Roztoky – příprava.....	- 29 -
3.2	Pracovní postup.....	- 30 -
3.2.1	Příprava buněčné suspenze	- 30 -
3.2.1.1	Rozmrazování buněčných suspenzí	- 30 -
3.2.1.2	Zamrazování buněčných suspenzí	- 30 -
3.2.1.3	Kultivace a pasážování buněk	- 31 -
3.2.1.4	Určení koncentrace a životnosti buněk	- 31 -
3.2.1.5	Příprava buněčné suspenze linie Ramos pro infekci	- 32 -

3.2.2	Příprava bakteriální suspenze.....	- 32 -
3.2.2.1	Příprava bakteriální suspenze <i>F.tularensis</i> LVS.....	- 32 -
3.2.2.2	Příprava bakteriální suspenze zabitě <i>F. tularensis</i> LVS.....	- 33 -
3.2.2.3	Výsev bakterií a odečet počtu kolonie tvořících jednotek CFU.....	- 33 -
3.2.3	Detekce genové exprese metodou RT-PCR.....	- 34 -
3.2.3.1	Pokus č. 1.....	- 34 -
3.2.3.2	Pokus č. 2.....	- 42 -
3.2.3.3	Pokus č. 3.....	- 48 -
4	VÝSLEDKY	- 55 -
4.1	Pokus č. 1.....	- 55 -
4.2	Pokus č. 2.....	- 59 -
4.3	Pokus č. 3.....	- 65 -
5	DISKUSE.....	- 70 -
6	ZÁVĚR.....	- 77 -
7	ABSTRAKT	- 78 -
8	ABSTRACT.....	- 79 -
9	POUŽITÉ ZKRATKY.....	- 80 -
10	POUŽITÉ ZDROJE.....	- 83 -

1 Úvod a cíl

Historie bakterie *Francisella tularensis* se datuje od počátku 20. století, kdy McCoy roku 1911 jako první popsal onemocnění drobných hlodavců v okolí jezera Tulare v Kalifornii v USA a podle místa výskytu jej označil jako tularemie. Původce onemocnění nazval *Bacterium tularense*. Díky výzkumu Edwarda Francise bylo zjištěno, že *Bacterium tularense* je také původcem tularemie u člověka. *Bacterium tularense* byla na počest Dr. Francise přejmenována na *Francisella tularensis* (Elkins, 2003).

Mimořádné vlastnosti *F. tularensis*, jako je vysoká odolnost a zcela mimořádná nakažlivost, vedla bohužel i k jejímu zneužití v rámci výroby biologických zbraní. Tato fakultativně intracelulární gramnegativní bakterie je řazena do třídy A potenciálních agens bioterorismu. Mezi vlastnosti patogenů jako potenciálních biologických zbraní patří např. vysoká morbidita a mortalita, nízká dávka potřebná k infekci, šíření aerosolem, neexistující vakcína, stabilita v prostředí atp.

V současné době se intenzivně hledají faktory virulence *Francisella tularensis*, které by byly dostatečně imunogenní a použitelné pro subjednotkové vakcíny (např. lipopolysacharid). Touto problematikou se, mimo jiné, zabývá také Ústav molekulární patologie Univerzity obrany v Hradci Králové.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak se mění exprese genů kódujících molekuly cytokinů u B buněčné linie Ramos RA-1 vlivem infekce *F. tularensis* a vlivem stimulace bakteriálním rekombinantním proteinem IgIC, který je považován za významný faktor virulence této bakterie, a lipopolysacharidem. K pokusům bylo využito metody reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce.

2 Teoretická část

2.1 *Francisella tularensis*

2.1.1 *F. tularensis* – patogen

F. tularensis je fakultativně intracelulární, gramnegativní, aerobní, nepohyblivá a nesporulující tyčkovitá bakterie.

Francisella je jediný rod čeledi *Francisellaceae*. V rámci rodu *Francisella* jsou na základě podobnosti DNA a složení mastných kyselin rozlišovány 2 druhy: *tularensis* a *philomiragia*. Druh *Francisella tularensis* je podle biochemických a molekulárních testů členěn do 4 poddruhů: *tularensis* (někdy také označován jako *F. tularensis* typu A), *holarctica* (*F. tularensis* typu B), *novicida* a *mediasiatica* (McLeod, 2006).

F. tularensis subsp. *tularensis*, která se vyskytuje výlučně v Severní Americe, je vysoce infekční, mortalita onemocnění bez léčby dosahuje až 60 % oproti evropskému virulentnímu kmeni *F. tularensis* subsp. *holarctica*, kde neléčené onemocnění vykazuje mortalitu do 5 %.

2.1.2 *F. tularensis* – faktory virulence

Faktory, které stojí za vznikem a vývojem chorobných změn v hostitelském organismu způsobených bakteriemi, se souhrně označují jako bakteriální faktory virulence. Úkolem těchto faktorů je zajistit bakteriím přilnutí na hostitelské buňky, průnik do těchto buněk, proliferaci uvnitř buňky, únik před obrannými mechanismy imunitního systému a zajistit další vývoj životního cyklu.

F. tularensis LVS (*F. tularensis* subsp. *holarctica* kmene LVS) má na svém povrchu polysacharidové pouzdro, které chrání bakterii proti jejímu zničení sérovým komplementem hostitele. Pouzdro *F. tularensis* obsahuje nezvykle vysoké množství lipidů v porovnání s jinými gramnegativními bakteriemi. Nicméně úloha pouzdra ve virulenci *F. tularensis* dosud nebyla přesně určena. Možnost uplatnění pouzdra v procesu vakcinace je předmětem výzkumu (McLendon, 2006; Sjöstedt, 2003a).

Dalším virulentním faktorem gramnegativních bakterií je lipopolysacharid (endotoxin), který tvoří důležitou složku vnější membrány gramnegativních bakterií.

Bakteriální LPS je tvořen komplexem amfifilních molekul a skládá se ze 3 základních částí: (1) jádrové oblasti (centrální sacharid), (2) z lipidu A, který ovlivňuje toxicitu LPS a má vliv na schopnost růstu bakterie v intracelulárním prostředí, a polysacharidového O antigenu (3), který určuje imunologickou specifitu. LPS je do membrány ukotven pomocí lipidu A. Lipid A je tvořený fosforylovaným N-acetylglukosaminovým dimerem s připojenými šesti až sedmi nasycenými mastnými kyselinami, které jsou navázány přímo na dimer nebo esterovou vazbou na 3-hydroxy mastnou kyselinu. Struktura lipidu A se příliš neliší mezi jednotlivými gramnegativními bakteriemi. Zbytek LPS vyčnívá z povrchu buňky do vnějšího prostoru. Jádrová oblast je na N-acetylglukosamin napojena v poloze 6 a je tvořena krátkými řetězci sacharidů. Mezi neobvyklé sacharidy patří heptóza a 2-keto-3-deoxyoktanová kyselina, která je přítomná ve všech LPS, v jiných sloučeninách se nevyskytuje. Polysacharidový O antigen je navázán na jádrovou oblast a je tvořen až 40krát se opakujícími podjednotkami 3 až 5 sacharidů. Mezi jednotlivými bakteriálními druhy i kmeny se vyskytuje velká rozmanitost sacharidů obsažených v O polysacharidu, imunologickou specifitu určují hlavně koncové sacharidy

(<http://www.textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>).

LPS *F. tularensis* má zvláštní strukturu a nemá vlastnosti jako klasický endotoxin. Na lipidu A jsou navázané neobvykle dlouhé mastné kyseliny, chybí zde fosforylace a α -glukosamin v poloze 3 není acylován. Ve struktuře se také objevují neobvyklé β -(1-6)glukany (Vinogradov, 2002). LPS *F. tularensis* rovněž vykazuje mimořádně nízkou toxicitu *in vivo* a *in vitro*. Jeho schopnost indukovat tvorbu IL-1 a TNF- α u mononukleárních buněk je 1000krát nižší než např. u LPS *E. coli*. Bylo také dokázáno, že existuje antigenní shift LPS *F. tularensis*, který ovlivňuje účinnost imunitní odezvy hostitele. Regulace délky řetězce O polysacharidu je nezbytná při růstu bakterie v makrofázích a také ovlivňuje rezistenci bakterie vůči sérovému komplementu (Sjöstedt, 2003a).

Na povrchu *F. tularensis* se také nachází komplexní struktury nazývané „pili typu IV“, které jsou kódovány *pil* geny. Pili typu IV jsou multifunkční, povrchová vlákna, jenž se vyskytují u mnoha různých bakterií jako *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa* a *Vibrio cholerae*. Jejich funkcí je připojení bakterie, pohyb a tvorba biofilmů. Delece *pil* genů má za následek značné oslabení virulence (Forslund, 2006).

Vstup *F. tularensis* do makrofágů není doprovázen respiračním vzplanutím. To je inhibováno bakteriální kyselou fosfatázou (AcpA). AcpA se proto řadí mezi virulentní faktory.

Po vstupu do makrofágů jsou bakterie *F. tularensis* lokalizované uvnitř fagozómu. Asi po 3 hodinách se fagozomální membrána rozpadá a mikrobi se uvolňují do cytosolu makrofágů, kde se masivně množí. *Francisella* pak vyvolá apoptózu makrofágů, bakterie se uvolňují z mrtvých buněk a napadají další neinfikované buňky (Oyston, 2004).

2.1.3 *F. tularensis* – původce tularemie

F. tularensis jako původce tularemie může způsobit následující klinické syndromy:

Glandulární a ulceroglandulární tularemie. V obou případech bakterie prostoupí kůží po kousnutí nakaženými členovci, poraněním nebo přímým kontaktem s nakaženým materiálem (např. mrtvá těla zvířat). Infekční dávka pro člověka je 10 až 50 bakterií. V průběhu ulceroglandulární formy (45 % až 85 % přirozeně se vyskytujících případů) se organismy množí lokálně a zapříčiňují tvorbu vředu během 3 až 5 dní po počáteční expozici. Vřed se vyvíjí jako důsledek lokální zánětlivé reakce, která zahrnuje fibrin, neutrofile, makrofágy a T lymfocyty. Počáteční ložisko se stává nekrotické a degeneruje během několika následujících dnů ve zvředovatělou lézi. Bakterie se dál šíří do místních lymfatických uzlin, kde způsobují nekrotizující lymfadenitidu obklopenou neutrofilním a granulomatózním zánětlivým infiltrátem. Mohou se šířit hematogenní cestou, zasáhnout více orgánů a vyústit až v celkovou sepsi. V průběhu glandulární formy tularemie jsou zasaženy místní lymfatické uzliny, ulcerace se nevyskytuje.

Plicní formou tularemie může člověk onemocnět vdechnutím aerosolu obsahujícího bakterie nebo po rozsevu bakterií krevní cestou, tzn. sekundární pneumonie jako následek tyfoidní formy. Bakterie rychle napadá plicní makrofágy a probíhá replikace. Vysoká schopnost replikace *F. tularensis* se zdá být důležitým faktorem virulence spojené s plicní infekcí. Plicní forma tularemie se často projevuje těmito znaky: ulcerózní zánět bronchů a bronchiolů, hemoragický edém s nespecifickou zánětlivou reakcí, nenápadné uzlíky s akutní hnisavou nekrózou plicního parenchymu,

pleurální fibrinózní a fibrocelulární exudací, pozdní fáze kaseózních lézí a tvorba granulomů (Gill, 1997).

Orofaryngeální tularemie vzniká po požití nebo vzdechnutí bakterií a následném proniknutí do sliznice orofaryngu. Obvykle se vyskytuje jako exudativní faryngitis nebo angína, s možností tvorby vředů. Bakterie se rozšíří do krčních lymfatických uzlin, kde může dojít k hnisání až nekróze.

Tyfoidní tularemie je systémové onemocnění. Původce proniká do krevního řečiště organismu poškozenou kůží nebo sliznicí. Po rozsevu bakterií krevní cestou jsou zasaženy především plíce a orgány retikuloendoteliálního systému. Může dojít k celkové sepsi, syndromu dechové tísně dospělých a diseminované intravaskulární koagulaci (<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/tularemia/biofacts/tularemiafactsheet.html>).

Rozsah onemocnění se může pohybovat od mírné infekce až po život ohrožující onemocnění. Před dostupností antibiotické terapie byla celková úmrtnost odhadována na 7 %, ačkoli případy spojené s pneumonií a jinou formou vážné infekce až 50 %. V současné době je úmrtnost nízká (asi 2 %). Většina pacientů s horečkou a celkovými příznaky odpovídá na antibiotickou terapii do 48 hodin. Tularemie typu A je vážnější než tularemie typu B, která je obvykle mírná (Dennis, 2001). Okolnosti spojované s nízkým účinkem terapie (relaps, prodloužení doby rekonvalescence, smrt...) souvisí s časovou prodlevou mezi propuknutím onemocnění a vyhledáním lékařské péče, se zpožděním v zahájení vhodné antibiotické léčby nebo v souvislosti se základním onemocněním (např. diabetes, alkoholismus) (Penn, 1987).

2.1.4 Tularemie – dostupné údaje o léčbě

V minulosti byly lékem první volby baktericidně působící aminoglykosidy, především streptomycin. V současné praxi je streptomycin zřídka používán, kvůli problémům s neuro- a ototoxicitou. Nahradil jej gentamicin. Z důvodu parenterální aplikace a neustálého monitorování hladin léků, se využití těchto antibiotik omezilo jen na závažné formy tularemie např. na tularemickou meningitidu (Tärnvik, 2003; Tärnvik, 2007; Enderlin, 1994).

Tetracykliny jsou součástí léčby tularemie, ačkoli mají pouze bakteriostatický účinek a jsou spojovány s častějším relapsem. Dnes převládá doxycyklin. Výhoda

tetracyklinů spočívá v perorálním podávání a nižší toxicitě (Tärnvik, 2003; Tärnvik, 2007).

Nové možnosti v léčbě nabídla chinolonová antibiotika, konkrétně ciprofloxacin. Osvědčil se jako účinný prostředek proti tularemii typu B. Z klinických studií vyplynulo, že by mohl splňovat předpoklady pro léčbu dětí a gravidních žen (Schaad, 1995; Johansson, 2000).

Neúčinná se ukázala betalaktamová antibiotika, kotrimazol a klindamycin. Erytromycin je označen jako nevhodný, kvůli výskytu rezistence v severní Evropě (Enderlin, 1994; Cross, 1993).

2.1.5 *F. tularensis* – imunita

Podobně jako u jiných intracelulárních bakterií, je po infekci *F. tularensis* vyvolaná silná primární imunitní odpověď zahrnující produkci prozánětlivých cytokinů a cytokinů produkovaných populací Th1 buněk, včetně IL-12, TNF- α , IFN- γ . TNF- α a IFN- γ jsou nezbytné pro kontrolu infekce, odstranění obou mění typicky subletální infekci v letální. Makrofágy, dendritické buňky a NK buňky jsou odpovědné za produkci IFN- γ velmi časně po infekci. Aktivace makrofágů zprostředkovaná TLR2, vede k produkci prozánětlivých cytokinů a může být rozhodující v časném rozpoznání patogenu (Elkins, 2003).

IFN- γ aktivuje iNOS v infikovaných myších makrofázích. Konečné produkty iNOS jsou NO \bullet (radikál oxidu dusnatého) a ONOO $^-$ (peroxynitrit). Jejich působení přispívá ke smrti bakterie uvnitř makrofága (Schaible, 1999; Nathan, 2000). Produkce TNF- α a IL-12 zvyšuje produkci IFN- γ a tím i produkci reaktivních dusíkových metabolitů. Bylo zjištěno, že mechanismy, které makrofágy používají k inhibici intracelulárního růstu francisely, se mohou trochu lišit v závislosti na tom, ze které tkáně pocházejí. Anti-LVS aktivita alveolárních makrofágů aktivovaných IFN- γ a ovlivněných inhibitory NO, inhibitory reaktivních kyslíkových radikálů a protilátkami proti TNF- α byla malá ve srovnání s aktivitou makrofágů z periferních tkání (Polsinelli, 1994). Infekce lidských makrofágů a role NO v odpovědi na tohoto intracelulárního patogena je sporná. Některá data poukazují, že během imunitní odezvy na infekci makrofágů vyvolanou *F. tularensis* není zahrnuta ani produkce dusíkatých ani kyslíkových reaktivních metabolitů (Fortier, 1994).

Aktivace inflamazómu (proteinový komplex, který obsahuje protein ASC a kaspázu 1) je rozhodující pro vrozenou imunitní odpověď, vede k indukci buněčné smrti infikované buňky doprovázené uvolněním prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18 (Santic, 2010; Mariathasan, 2005; Gavrilin, 2006).

Úloha B buněk během časně fáze imunitní odpovědi byla dlouhou dobu opomíjena. Přímá interakce intracelulární bakterie s B buňkami byla poprvé popsána Menonem *et al.* (2003). Zjistil, že *Listeria monocytogenes* je schopná interakce s B buňkami a vyvolat jejich apoptózu. Kročová *et al.* (2008) zjistili přímou interakci mezi *F. tularensis* a lidskou B buněčnou linií Ramos. Výsledkem interakce byla také apoptóza B buněk.

Poměrně dlouhou dobu nebyla akceptována úloha specifických protilátek v průběhu imunitní odpovědi k infekci *F. tularensis*, což bylo prokázáno v několika experimentech provedených v poslední době. V jednom z pokusů byl použit kmen LVS *F. tularensis* subsp. *holarctica* a klinický izolát *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Úloha protilátek byla zkoumána na myších kmene C57BL/10, které byly deficitní na B buňky. Po přenesení rozpustných protilátek do těchto myší, byla pozorována zvýšená rezistence k jinak smrtelné i.p. dávce *F. tularensis* kmene LVS. Následné pokusy po intradermální infekci *F. tularensis* LVS, přinesly přímý důkaz, že přítomnost patogen-specifických protilátek chrání hostitele během infekce intracelulárním patogenem. Jedním z mechanismů, kterým specifické protilátky přispívají ke kontrole infekce *F. tularensis* může být produkce TNF- α a IL-12 v kůži. Tato fakta potvrzují předchozí výsledky, že specifické protilátky hrají důležitou roli v získané imunitní odpovědi ke kmenu *F. tularensis* LVS, ne však k vysoce virulentnímu kmenu *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Nicméně přenos imunního séra s následnou infekcí klinickým izolátem *F. tularensis* subsp. *holarctica* udělil hostiteli významnou ochranu (Stenmark, 2003; Stenmark, 2004).

Vystavení subletální dávce bakterií *Francisella* vyvolává silnou ochrannou imunitu při dalším setkání se s patogenem u lidí i na zvířecích modelech. Specifická imunita k infekci *F. tularensis* je do značné míry závislá na CD4⁺ a CD8⁺ T-buňkách. Specifické T-buňky aktivují makrofágy, které pak dokáží bakterie eliminovat (Elkins, 2003).

2.2 Interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami

F. tularensis má schopnost infikovat různé typy lidských i zvířecích buněk, zejména profesionální fagocyty (makrofágy, dendritické buňky a hepatocyty), ale i další typy buněk (např. fibroblasty, endoteliální a epiteliální buňky) a pomnožit se v nich. Obecně jsou za hlavní rezervoár *F. tularensis in vivo* považovány makrofágy (lidské, myší, krysí, králičí a morčecí) (Sjöstedt, 2006; McLendon, 2006).

2.2.1 Interakce s makrofágy

K fagocytóze částic a mikroorganismů dochází po specifické interakci mezi receptory a ligandy a je umožněná polymerizací aktinu (McLendon, 2006).

Do této doby není přesně objasněno, které struktury makrofágů se účastní počáteční interakce s *F. tularensis*. Předpokládá se, že hlavní roli sehrávají povrchové receptory TLR 2 (Cole, 2008). Některé práce rovněž poukazují na význam receptorů pro komplement CR3 a CR4 (Balagopal, 2006) a receptor pro manózu (Schulert, Allen, 2006), ovšem jejich úloha není úplně jasná. Molekula LPS *F. tularensis* je strukturálně odlišná a díky tomu reaguje jen minimálně s TLR 4 (hlavním receptorem pro LPS) (Dueñas, 2006). Dochází ale k vazbě *F. tularensis* na jiný toll-like receptor, TLR 2, kdy byla sledována aktivace signální cesty NFκB, a to ve spojení s adaptorovým proteinem MyD88 (Collazo, 2006). Předpokládá se zapojení i jiných adaptorových proteinů (př. TIRAP), které ovšem nejsou nezastupitelné v buněčné signalizaci (Cole, 2010). Struktury *F. tularensis*, které mají podíl na kontaktu s hostitelskou buňkou jsou adheziny a pili typu IV (Zogaj, 2008).

Při klasické fagocytóze (např. *M. tuberculosis*) dochází k těsnému obklopení částice po celém obvodu symetrickými panožkami. Navíjecí (coiling) fagocytóza je charakterizovaná těsnými vrstvami asymetrických panožek, je typická pro *L. pneumophila*. Ovšem pohlcení *F. tularensis* lidskými makrofágy se od obou předchozích typů liší. Bakterie je obklopována prostornými asymetrickými kličkami z panožek. K tomuto procesu je nezbytná přítomnost komplementového faktoru C3 a komplementového receptoru CR3. Molekulární cíl vazby komplementu zatím nebyl zcela objasněn, zvažována je role LPS. Tvorbu panožek spouští nejen živé, ale také formalínem nebo teplem usmrcené bakterie, není tedy závislá na její metabolické

aktivitě. Utváření panožek inhibuje cytochalasin B, který blokuje polymerizaci a prodlužování aktinových vláken, v závislosti na dávce (Clemens, 2005).

Fagozóm obsahující živou *F. tularensis* (FCP) prochází během zrání několika fázemi, během prvních 15 minut probíhá fáze časného endozómu vyznačující se markerem EEA1. Jeho exprese klesá asi během 60 minut, kdy se postupně na fagozomálním povrchu v důsledku interakcí s endozómy exprimují molekuly LAMP 1 a LAMP 2 (fáze pozdního endozómu, maximum asi za 2 – 4 hodiny po prvním kontaktu). Do této chvíle nebylo rozhodující, zda pohlcená *F. tularensis* stále žije. Zatímco fagozómy s mrtvými bakteriemi po čase exprimují na svých površích i katepsin D (došlo tedy k vzniku fagolysozómu) a jsou postupně acidifikovány, živé bakterie zabrání zrání fagozómu v této fázi a nedochází k jeho okyselení (Clemens, 2004). Již velmi časně po pohlcení unikají bakterie z fagozómu do cytosolu hostitelské buňky, kde se začínají množit (Golovliov, 2003). Bylo zjištěno, že během 16 hodin od prvního kontaktu se nejvýše 15 % všech intracelulárních mikrobů nachází uvnitř fagozómů. Mechanismus úniku *F. tularensis* z fagozómu není zcela objasněn. Krátce po infekci získává 25 – 50 % fagozómů denzní vrstvu z fibrilární hmoty. Tento povrchový plášť se ale brzy začíná narušovat a dochází k rozpadu fagozómu. Zatímco je do 90 minut od prvního setkání 80 – 90 % všech mikrobů uvnitř fagozómů, klesá tento poměr do 6 hodin na 50 % a v průběhu 16 hodin až na 15 % (Clemens, Horwitz 2007; Golovliov, 2003; McCaffrey, Allen, 2006).

F. tularensis lokalizovaná v cytoplazmě interaguje se specifickými signálními cestami. Aktivuje inflamazóm, multimolekulární proteinový komplex, složený z receptoru rodiny NOD-like, adaptorového proteinu ASC a kaspázy 1. Aktivovaná kaspáza 1 potom štěpí neaktivní formu pro-IL-1 β a pro-IL-18 na její aktivní formy (Gavrilin, 2006). Podrobnou analýzou podmínek aktivace inflamazómu se zjistilo, že pro jeho aktivaci a další signalizaci je důležitý transkripční faktor IRF 3, jehož pozitivním regulátorem je IFN- γ . Mezi geny řízené transkripčním faktorem IRF 3 patří mimo jiné i IFN- α a β (Weiss, 2007).

F. tularensis vyskytující se volně v cytoplazmě je schopna během 24 – 48 hodin spustit cytopatogenní změny směřující k apoptóze. Dochází k aktivaci mitochondriální dráhy apoptózy, tzn. porušení celistvosti mitochondriálních membrán následované uvolněním cytochromu c a aktivací kaspáz 9 a 3 (Lai, Sjöstedt, 2003; Lai, 2004).

Dochází ke zvýšení exprese molekuly Fas v infikovaných buňkách v přímé souvislosti s únikem *F. tularensis* do buněčného cytosolu. Hrstka *et al.* (2005) prokázali, že indukce apoptózy je závislá na fosforylaci ERK 1/2 (p42/p44 MAPK). Mechanismy aktivace apoptózy jsou tedy pravděpodobně závislé jak na indukci výše zmíněných kaspáz 3 a 9, tak na zásahu do signalizačních drah MAPK. Bylo navíc popsáno, že *F. tularensis* interaguje jak se signální dráhou MAPK (c-Jun a p38), tak NFκB už v průběhu jedné hodiny od infekce. Zabraňuje tímto aktivaci infikovaných makrofágů včetně následné produkce prozánětlivých cytokinů, jako IL-1 a TNF-α. To ve své podstatě ještě více přispívá nejen k anergii infikovaných buněk, ale i k jejich vyšší vnímavosti vůči proapoptickým stimulům (Telepnev, 2003; Telepnev, 2005).

Autofagie je jedním z jevů provázejících jiný další typ programované buněčné smrti, během kterého dochází k cytosolovému oddělení v rámci snahy nakažené buňky ohraničit bakterii do autofagozomu. Tato uvedená forma buněčné smrti nespouští zánětlivé procesy, ale hraje roli při prezentaci bakteriálních antigenů ve spojení s molekulami HLA II. třídy (Hrstka, 2007).

Přestože se v poslední době objevilo mnoho studií, stále není cyklus této bakterie uvnitř makrofágů dostatečně detailně popsán.

2.2.1.1 IglC

Za schopnost *F.tularensis* proliferovat uvnitř makrofágů odpovídají geny, které jsou hlavní součástí unikátní oblasti genomu označované jako ostrov patogenity (FPI). Jako klíčové se jeví dva bakteriální operony, *mglAB* a *iglABCD*. Předpokládá se, že oblast *mglAB* kóduje dva proteiny (MglA a MglB), které zastávají nejspíš funkci regulátorů genové exprese. Použitím mutovaných bakteriálních kmenů bylo prokázáno, že proteiny MglA, IglC a IglD se přímo či nepřímo podílejí na blokaci acidifikace fagozomu a jsou nutné pro únik *F. tularensis* z fagozomu (Bonquist, 2008). Protein IglC (23kDa protein) je v bakteriálním světě strukturálně unikátní, jeho centrální struktura je tvořena β-skládaným listem (Sun, 2007). Bylo publikováno, že mutované kmene *F. tularensis* LVS s deletovaným genem *iglC* ($\Delta IglC$) nebyly schopny intracelulárního růstu, neindukovaly apoptózu a jejich množství uvnitř buněk s časem klesalo. Kmen $\Delta IglC$ též nevykazoval cytopatogenní efekt infikovaných buněk (Lai, 2004; Golovliov, 2003). To, že je IglC důležitým virulentním faktorem dokládají experimenty, kdy byly myši imunizované rekombinantním atenuovaným vakcinačním kmenem *Listeria*

monocytogenes exprimujícím *F. tularensis* Ig1C a po následné aerogenní infekci byly chráněné proti *F. tularensis* typu A (Jia, 2009).

2.2.2 Interakce *F. tularensis* s B buňkami, časná imunitní odpověď

Nejdůležitější funkce B buněk je tvorba specifických protilátek v adaptivní imunitní odpovědi. V poslední době se ovšem objevují práce, které dokazují také zapojení B buněk v časné, nespecifické odpovědi. V případě infekcí intracelulárními bakteriemi mají B buňky kromě produkce protilátek (jež mají ale jen malý význam vzhledem k lokalizaci patogenu uvnitř buňky, která ho chrání před účinným navázáním protilátek) také různé imunoregulační funkce: prezentaci antigenu, produkci různých cytokinů či chemokinů, např. IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, a TNF- α a β . Některé z těchto cytokinů mohou sloužit k další aktivaci buněk. Důležitými jsou IL-6, TNF- α a β a IL-12, které se účastní regulace produkce IFN- γ a aktivace makrofágů v mnoha intracelulárních infekcích, včetně *F. tularensis* LVS infekce (Culkin, 1997; Dreisbach, 2000).

Silným stimulantem B buněk je lipopolysacharid gramnegativních bakterií. B buňky exprimují na svém povrchu dva receptory z rodiny TLR pro LPS, a to TLR4 a RP105 (CD180), aktivací těchto dvou receptorů se spustí dvě nezávislé signální dráhy. Zatímco TLR4 se nachází na různých typech buněk imunitního systému, receptor RP105 je přednostně exprimován pouze na B buňkách a dendritických buňkách. Navázáním LPS na RP105 dochází k fosforylaci tyrozinového zbytku proteinu CD19, aktivaci Lyn kinázy, fosforylaci proteinu Vav a následné aktivaci JNK. Cestou nezávislou na CD19 přes Lyn kinázu a BTK může také docházet k aktivaci NF κ B. Signální cesta závislá na adaptorovém proteinu MyD88 vede přes TLR4, IRAK a TRAF6 k aktivaci transkripčního faktoru NF κ B (Yazawa, 2003).

2.2.3 Přímá interakce *F. tularensis* s B buňkami

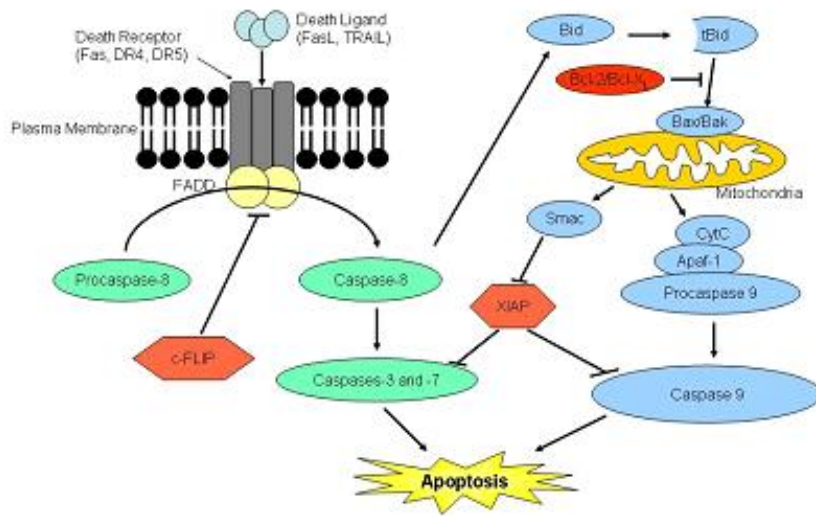
Přímé interakce mezi nitrobuněčnými patogeny a B buňkami nebyly donedávna hlouběji studovány. Menon *et al.* (2003) popsali jako jednu z možných strategií zahájení infekce schopnost intracelulární bakterie *Listeria monocytogenes* infikovat a zabít B buňky. *L. monocytogenes* adherovala na povrch B buněk, došlo ke ztrátě některých povrchových znaků hostitelských buněk, vzniku pórů v membráně, následně k desintegraci a apoptóze.

Možná účast B buněk v časné fázi imunitní odpovědi k intracelulární bakterii *F. tularensis* je také studována na pracovišti ÚMP FVZ UO v Hradci Králové. Nedávno byla provedena studie, která objevila schopnost přímé interakce B buněk s *F. tularensis*. Byly pozorovány lidské (Ramos) a myší (A20) B buněčné linie a slezinné buňky. K infekci více než 20 % buněk došlo do 24 hodin po infekci. Živé bakterie způsobily apoptózu u buněčné linie Ramos a slezinných myších CD19⁺ buněk. Přibližně 30 % buněk prodělalo apoptózu po 24 hodinách a 70 % buněk po 48 hodinách nezávisle na použitém kmenu *F. tularensis*. V obou časových intervalech se u buněk neinfikovaných a infikovaných mrtvou *F. tularensis* nacházelo asi 10 % apoptotických buněk, z čehož plyne, že jen živá bakterie je schopná vyvolat apoptózu (Krocova, 2008).

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, může být vyvolaná různými signály z vnějšího i vnitřního prostředí buňky. Vnější cesta aktivace apoptózy začíná na cytoplazmatické membráně po navázání ligandu na „receptor smrti“ (DR - Death Receptor) s následnou indukcí vzniku buněčnou smrt navozujícího signalizačního komplexu (DISC). Ten dává vzniknout aktivním kaspázám 8 a 10, které pak aktivují efektorové prokaspázy 3, 6 a 7. Vnitřní cesta apoptózy je způsobena poškozením vnější mitochondriální membrány s následným uvolněním mitochondriálních proteinů. Jedním z nich je cytochrom c, který v cytosolu spouští tvorbu apoptozómu - molekulární základny složené z Apaf-1, dATP a cytochromu c. Uvedené děje ústí v aktivaci kaspázy 9, která stěpí a aktivuje efektorové prokaspázy. Vnitřní cesta apoptózy je regulovaná pro- (*Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bid*, *Bim*) a protiapoptotickými (*Bcl-2*, *Bcl-X_L*) geny z rodiny Bcl-2. Kaspáza 8 účastní se vnější cesty vede také ke štěpení Bid proteinu, za vzniku tBid, který přestupuje do mitochondrie a spouští cestu mitochondriální smrti (Obr. 1) (Jiang, Wang, 2004; Zimmermann, 2001; Lawen, 2003).

Živná *et al.* (2010) popsali cesty vedoucí k apoptóze Ramos buněčné linie po infekci *F. tularensis*. Živá bakterie aktivuje kaspázy 8, 9 a 3, stejně jako Bid, z mitochondrií uvolňuje cytochrom c a AIF a vyvolává depolarizaci mitochondriální membrány a vede k apoptóze. Naproti tomu, usmrcená *F. tularensis* aktivuje pouze kaspázu 3, vyvolává akumulaci Bcl_{X_L} (antiapoptotický protein) v mitochondriální membráně a nezpůsobuje apoptózu buněčné linie Ramos.

Obr. 1 Signální cesta vedoucí k apoptóze



Vysvětlivky:

Death Receptor - receptor smrti; Death Ligand - ligand smrti; Plasma Membrane - plasmatická membrána; Mitochondria - mitochondrie; Apoptosis – apoptóza

(webový zdroj, uvedeno jako poslední položka použitých zdrojů)

2.3 PCR s reverzní transkripcí

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí, RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), je laboratorní technikou pro amplifikaci určitého segmentu molekuly RNA. Její řetězec je nejprve (reverzně) celý přepsán do komplementární DNA (cDNA) a poté následuje amplifikace specifické DNA pomocí PCR. Tyto 2 kroky se dají dělat postupně nebo dohromady.

V prvním kroku RT-PCR, někdy nazývaném „first strand reaction“, je vytvořen řetězec komplementární DNA z templátu (matrice) messengerové RNA za použití deoxyribonukleotidů (ve formě trifosfátů - dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a RNA-dependentní DNA polymerázy (= reverzní transkriptázy) během procesu reverzní transkripce. Výše uvedené komponenty jsou smíchány s jednořetězovým úsekem DNA (primer) v pufru (reverse transcriptase buffer) na cca 1 hodinu při teplotě kolem 37 °C.

Po dokončení reverzní transkripce, tj. poté, co byla vytvořena komplementární DNA z původní jednořetězové mRNA, je zahájena standardní polymerázová řetězová reakce. Jsou přidány termostabilní DNA polymeráza, přímé (sense) a zpětné (antisense) DNA primery. Pro usnadnění vazby DNA primerů na cDNA (tzv. annealing) je reakce zahřívána na teplotu specifickou pro strukturu/sekvenci primerů (50 – 70 °C). Další zahřívání (65 – 75 °C) umožňuje termostabilní DNA polymeráze tvorbu dvouřetězové DNA z primerů navázaných na cDNA (elongace/extenze). Reakce je poté zahřívána přibližně na 95 °C pro separaci DNA řetězců (denaturaci). Směs je poté opět ochlazena na teplotu, která opět umožní vazbu primerů a cyklus se opakuje. Přibližně po 30 – 40ti cyklech jsou vytvořeny miliony kopií požadovaných sekvencí. Finálním krokem je konečná elongace při teplotě 72°C po dobu 5 – 15 minut, kdy dochází k dokončení syntézy částečných produktů, a zchlazení PCR reakce na teplotu 4 – 15 °C (<http://www.lfhk.cuni.cz/farmako/interakce/micuda/mRNA.htm>) (<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>).

Střídáním tří teplot dochází k exponenciálnímu množení požadovaného úseku DNA vymezeného dvojicí použitých primerů. Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Zkumavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu nastaveného uživatelem. Reakční směs je podobně jako u jiných biochemických reakcí

sestavena v mikrozkuhavce (PCR zkuhavce), odlišnost spočívá v tom, že mikrozkuhavka musí být tenkostěnná, aby umožňovala rychlé změny teplot vzorku. Obvyklé je také sestavování reakční směsi tzv. „na ledu“, tzn. že mikrozkuhavka je stále chlazená na teplotu mírně nad 0 °C, aby se zabránilo předčasné aktivitě Taq-polymerázy. Při laboratorní teplotě totiž mohou primery nespecificky nasednout na místa, která neodpovídají zcela jejich sekvenci, a Taq-polymeráza by mohla zahájit jejich extenzi. Reakční směs by tak mohla být hned zpočátku obohacena o nespecifické produkty, které by v pozdějších krocích snižovaly účinnost reakce, příp. by vedly ke vzniku zcela chybných produktů. Dokonale lze toto riziko eliminovat jen tzv. horkým startem reakce (<http://biologie.upol.cz/metody/>).

RT-PCR poskytuje vysoce citlivou techniku, která umožňuje detekovat velmi malý počet kopií RNA molekul. RT-PCR je rozšířená v diagnostice dědičných onemocnění, kvantifikaci specifických RNA molekul v buňkách a tkáních jako míry genové exprese (<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/mRNA.htm>).

2.3.1 Optimalizace PCR

Cílem optimalizace je specifický průběh PCR reakce, tzn. aby vznikal pouze jediný produkt odpovídající amplifikovanému úseku. Výsledek PCR reakce je proto ověřován na gelu. Je několik možností:

- změna teploty nasednutí primeru („annealing“) – snížením umožníme lepší vazbu primerů na templátovou DNA, přílišné snížení však může vést k tvorbě nespecifických produktů. Ideální je provést gradientový pokus a následně vybrat nejvhodnější teplotu.
- zvýšení koncentrace MgCl₂ – hořčík stabilizuje komplex DNA–polymeráza, zvýšení koncentrace na 2,5 – 6,0 mM (standardní koncentrace je 1,5 – 2,0 mM) může přinést úspěch.
- přidání aditiv – některé látky (DMSO, formamid, betaine, glycerol, BSA, (NH₄)₂SO₄) mohou zvyšovat stabilitu polymerázy, specifičnost vazby primerů.
- modifikace cyklu – prodloužení (zkrácení) doby elongace, zvýšení počtu cyklů, apod.

V případě, že produkt PCR reakce není zřetelný nebo je výsledkem více produktů odlišné délky (nespecifické produkty), reakce neproběhla optimálně. Je nutné změnit reakční podmínky tak, aby PCR proběhla úspěšně.

(<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>).

2.3.2 Detekce amplikonů na gelu

Výsledek PCR amplifikace lze tzv. detekovat na gelu, tzn. že vzorek reakční směsi je nanesen na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze. Elektroforézu je nutné vypnout v okamžiku, kdy jsou molekuly nukleových kyselin přiměřeně roztrženy. Pokud by elektrické pole působilo příliš dlouho, molekuly by z gelu vycestovaly až ke kladně nabitě elektrodě, kde by došlo k jejich degradaci. Protože ale nukleové kyseliny nemůžeme během elektroforézy v gelu vidět, přidáváme k nim při nanášení na gel i tzv. sledovací barvivo, které se pohybuje podobně jako molekuly DNA určité velikosti.

Protože jsou molekuly během elektroforézy stále v pohybu, záleží poloha konkrétní molekuly v gelu na síle použitého elektrického pole a době putování. Pokud předem neznáme velikost molekul, které třídíme, můžeme ji zjistit pouze srovnáním s velikostí známých molekul, které budou vystaveny stejným podmínkám třídění. Proto se při gelové elektroforéze používají tzv. markery molekulové hmotnosti (<http://biologie.upol.cz/metody/>).

Molekuly nukleových kyselin lze vizualizovat UV světlem po inkorporaci UV fluorescenčního barviva (např. Syber Green, ethidiumbromid) do struktury dvoušroubovice.

Pokud primery nasedaly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce molekuly stejné sekvence a délky dané vzdáleností míst, na které nasedaly primery. Při dělení v gelu budou všechny tyto molekuly putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh, jehož molekulová hmotnost odpovídá při srovnání se standardem předpokládané délce molekuly. Pokud není zobrazen žádný pruh, polymerázová řetězová reakce neproběhla, pokud je zobrazeno

více pruhů, tak PCR neproběhla optimálně. V takovém případě je nutné optimalizovat podmínky reakce (<http://biologie.upol.cz/metody/>).

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitého materiálu

3.1.1 Buněčné linie a bakterie

Ramos – B buněčná linie Ramos RA-1 (ATTC number: CRL-1596)

Francisella tularensis LVS (FOI Umea, Švédsko) (*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* živý vakcinační kmen)

3.1.2 Primery pro RT-PCR

β_2 -mikroglobulin (GeneriBiotech)

Sense: 5'- GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA – 3'

Antisense: 5'- CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC – 3'

IFN- γ (GeneriBiotech)

Sense: 5'- AGA GTG TGG AGA CCA TC – 3'

Antisense: 5'- CTT TGC GTT GGA CAT TCA – 3'

IL-10 (GeneriBiotech)

Sense: 5'- GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT – 3'

Antisense: 5'- CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT CT – 3'

TGF- β (GeneriBiotech)

Sense: 5'- CTC CCA CTC CCG TGG CTT CTA – 3'

Antisense: 5'- GTT CCA CAT GTT GCT CCA CAC TTG – 3'

TNF- α (GeneriBiotech)

Sense: 5'- TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC – 3'

Antisense: 5'- GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG – 3'

3.1.3 Média, roztoky a chemikálie

0,5 % roztok trypanové modři v PBS

0,5× TBE pufr (příprava v kapitole 3.1.5)

1 kB Plus DNA Ladder (Invitrogen)

1× FA Gel Running Buffer

10× PBS (příprava v kapitole 3.1.5)

10× FA Gel Buffer (příprava v kapitole 3.1.5)

10× PCR Rxn Buffer (Invitrogen)

10× TBE pufr (příprava v kapitole 3.1.5)

10× TrueStart Taq Buffer (Fermentas)

5× First Strand Buffer (Invitrogen)

96% ethanol (Lachema)

β-mercaptoethanol, 14,3M (Sigma)

dATP, 100 mM (Invitrogen)

dCTP, 100 mM (Invitrogen)

dGTP, 100 mM (Invitrogen)

dTTP, 100 mM (Invitrogen)

DTT, 0,1 M (Invitrogen)

EDTA (Serva)

Ethidium bromid, 10 mg/ml (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Glycerol (Fluka)

Chloroform (Lachema)

IgIC (Apronex) (rekombinantní protein rozpuštěný v pufru: 50 mM TRIS, NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol)

Isopropylalkohol (Lachema)

Kultivační médium: DMEM + GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle medium) GIBCO (Invitrogen)

Kultivační pevné půdy McLeod

Kyselina chlorovodíková 35% (Lachema)

LPS (*E. coli*) – zásobní roztok – 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace 1 µg/ml (Sigma)

LPS (*F. tularensis*) – zásobní roztok – 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace 1 µg/ml (FOI Umea, Švédsko)

MgCl₂, 50 mM (Invitrogen)

MOPS, 200 mM (Fluka)

M-MLV RT (reverzní transkriptáza, Invitrogen)

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer, 0, 5 µg/µl (Invitrogen)

pUC Mix Marker 8, 0, 5 µg/µl (Fermentas)

RLT pufr (Qiagen)

Rnase⁻ voda (Invitrogen)

RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor, 40 U/µl (Invitrogen)

RPE pufr (Qiagen)

RW1 pufr (Qiagen)

Sodium acetate, 50 mM (Fluka)

T18VN Oligo Primer, 0,1 mM (GeneriBiotech)

Taq DNA polymerase (Invitrogen)

Trackit Cyan/Orange Loading Buffer (Invitrogen)

TRIS (Serva)

TRIzol (Invitrogen)

TrueStart Taq DNA polymerase (Fermentas)

Zamrazovací médium: DMEM médium + 10% séra + 10% DMSO

3.1.4 Přístroje a pomůcky v laboratoři

Automatické pipety 1, 10, 20, 100 a 1000 µl (Eppendorf)

Bakteriální kličky (TPP)

Centrifuga BR4i (Jouan)

Centrifuga Pico (Heraeus)

Denzitometr C08000 (WPA Bioware)

Elektroforetická vana Mupid (LabMark)

Forma na gely, hřebínky na gely
Kolonky pro izolaci RNA Rneasy mini column (Qiagen)
Kultivační lahve (TPP)
Kyvety (Scholler)
Laboratorní váhy (Kern)
Latexové rukavice (Hartmann)
Magnetická míchačka (Ika)
Mikroskop inverzní IDM (Meopta)
Mikroskop světelný binokulární (Amplival)
Pipety 2, 5, 10 ml (Biotech)
Plastové zkumavky na PCR (Eppendorf)
Plastové zkumavky s víčkem o objemu 1, 5 ml (Eppendorf)
Počítací komůrka dle Bürkera (Meopta)
Spektrofotometr NanoPhotometer (Implen)
Sterilní škrabky (Lukasterik)
Špičky 1, 10, 20, 100 a 1000 μ l (Eppendorf)
Termocycler PTC-200 (Biotech)
Termostat (Assistent)
Třepačka MS2 (Ika)
UV- transiluminátor (Vilber Lourmat)
Zkumavky na infekci o objemu 15 ml (TPP)

3.1.5 Roztoky – příprava

10× TBE pufr

K přípravě zásobního roztoku 10× TBE pufru bylo naváženo 54 g TRIS, 27,5 g kyseliny borité, odměřeno 20 ml 0,5 M EDTA a doplněno do 500 ml deionizovanou vodou. Kyselinou chlorovodíkovou bylo upraveno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

0,5× TBE pufr

Dvacetinásobným naředěním 10× TBE pufru byl připraven 0,5× TBE pufr (tj. k 950 ml deionizované vody bylo přidáno 50 ml 10× TBE pufru).

2 % agarózový gel

2,0 g agarózy byly opatrně v mikrovlnné troubě rozvařeno ve 100 ml 0,5× TBE pufru.

10× FA Gel Buffer

V 50 ml Rnase^- vody bylo rozpuštěno 2,09 g 200mM MOPS, 0,21 g 50mM Sodium acetate a 10mM EDTA. Hydroxidem sodným bylo upraveno pH na hodnotu 7,0.

1× FA Gel Running Buffer

Pro přípravu pufru bylo odpipetováno 10 ml 10× FA gel pufru, 2 ml 37% formaldehydu a doplněno 88 ml Rnase^- vody.

1,2 % agarózový gel

1,2% agarózový gel pro kontrolu kvality RNA byl připraven rozvařením 0,48 g agarózy ve 4 ml 10× FA gel pufru a 36 ml Rnase^- vody.

10 mM dNTP mix

Smísením 10 μl dATP, 10 μl dCTP, 10 μl dGTP, 10 μl dTTP a 60 μl Rnase^- vody byla připravena 10mM směs deoxyribonukleotidtrifosfátů.

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Příprava buněčné suspenze

(pracovní postupy přežaty z Diplomové práce Bc. Lenka Kasmanová, 2009)

3.2.1.1 Rozmrazování buněčných suspenzí

Kryozkumavka obsahující zamrazenou buněčnou kulturu (B buněčná linie Ramos) byla vyjmuta z mrazicího boxu s kapalným dusíkem a rychle rozmrazena pod tekoucí teplou vodou. Ve sterilním boxu byl obsah kryozkumavky přenesen pipetou do nové zkumavky a bylo přidáno malé množství kultivačního média. Zkumavka byla centrifugována 5 minut při 300 g. Poté byl odstraněn supernatant. K buněčným peletám bylo přidáno malé množství kultivačního média a byly řádně protřepány. Buněčná suspenze byla přenesena pipetou do kultivačního média a mírně pootevřená kultivační láhev byla uložena do termostatu. Kultivace probíhala 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂. Za 24 hodin bylo z buněčné kultury odebráno 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4).

3.2.1.2 Zamrazování buněčných suspenzí

Zamrazovat lze pouze buněčnou kulturu s životností více než 90 %.

Kultivační láhev obsahující buněčnou kulturu v kultivačním médiu byla zkontrolována pod inverzním mikroskopem. Byla hodnocena hustota, kvalita buněk a čistota média. Po zhodnocení bylo odebráno 10 µl kultivačního média s buněčnou kulturu na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4) a poté bylo provedeno pasážování buněk (kapitola 3.2.1.3).

Buněčná suspenze byla v laminárním boxu přenesena z kultivační láhve do zkumavky. Zkumavka byla centrifugována 5 minut při 300 g a vzniklý supernatant byl odstraněn. K buněčným peletám bylo přidáno zamrazovací médium (na $1 \cdot 10^6$ buněk připadá 1 ml zamrazovacího média), obsah byl řádně protřepán a přenesen pipetou do kryozkumavek. Kryozkumavky byly vloženy do polystyrenového obalu a zamrazeny na -80 °C. Druhý den byly kryozkumavky přeneseny do mrazicího boxu s kapalným dusíkem.

3.2.1.3 Kultivace a pasážování buněk

Buněčná kultura v kultivační láhvi byla zkontrolována pod inverzním mikroskopem. Byla hodnocena hustota a kvalita buněk a čistota média. Ve sterilním boxu byla uzavřená kultivační láhev řádně protřepána. Pipetou bylo asepticky odebráno 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4). V kultivační láhvi bylo ponecháno pouze takové množství buněčné kultury, které bylo potřebné pro další růst. K buněčné kultuře bylo přidáno kultivační médium o množství uvedeném v tabulce 1. Mírně pootevřená kultivační láhev byla vložena do termostatu a inkubována při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂.

Tab. 1 Kultivační médium

Obsah dna kultivační láhve (cm ²)	Množství buněčné kultury (počet buněk)	Množství kultivačního média (ml)
150	3 – 4 . 10 ⁶	do 50
75	1 – 2 . 10 ⁶	do 20
25	0,5 – 1 . 10 ⁶	do 10

3.2.1.4 Určení koncentrace a životnosti buněk

Z protřepané buněčné suspenze bylo asepticky odebráno 10 µl, smícháno s 10 µl trypanové modři a směs byla napipetována pod krycí sklíčko Bürkerovy komůrky, která slouží k počítání buněk. Pod světelným mikroskopem byly počítány buňky uvnitř a na obvodu dvou zvolených stran ve 25 čtvercích. Počítány byly živé i mrtvé buňky. Mrtvé buňky na rozdíl od živých („zářících“) byly zbarveny modře. Součet byl proveden dvakrát.

Určení životnosti buněk

Počet živých buněk byl vydělen počtem všech buněk (součet živých a mrtvých buněk). Vypočítané číslo bylo vynásobeno číslicí 100 pro získání údaje o životnosti v %. Životnost by se měla pohybovat v rozmezí 95 – 99 %.

Určení koncentrace buněk

Počet buněk v 1 ml suspenze byl vypočítán podle následujícího vzorce:

průměrný počet živých buněk × *ředění trypanovou modří* × *koefficient Bürkerovy komůrky*

ředění trypanovou modří 2

koefficient Bürkerovy komůrky.....10 000

3.2.1.5 Příprava buněčné suspenze linie Ramos pro infekci

Z protřepané buněčné suspenze linie Ramos bylo asepticky odpipetováno 10 µl, smícháno s 10 µl trypanové modří a určena koncentrace a životnost buněk (kapitola 3.2.1.4). Podle potřebné koncentrace buněk v 1 ml byl vypočítán objem buněčné suspenze odpovídající celkovému počtu buněk. Daný objem buněčné suspenze byl asepticky pipetou odebrán z kultivační láhve, přemístěn do zkumavky a centrifugován 7 minut při 300 g. Poté byl odstraněn supernatant. Pelety byly roztřepány a doplněny kultivačním médiem do objemu potřebného pro infekci.

3.2.2 Příprava bakteriální suspenze

3.2.2.1 Příprava bakteriální suspenze *F.tularensis* LVS

Na 3 plotny McLeod byla masivně naočkována bakterie *F. tularensis* LVS. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Za 24 hodin byly plotny vyjmuty z termostatu. Ve sterilním boxu byla bakteriální kličkou opatrně setřena z plotny část bakteriální kultury. Klička byla otírána o vlhkou stěnu zkumavky obsahující 4 ml PBS tak, aby na stěně nezůstaly žádné shluky bakterií. Poté byla změřena optická denzita bakteriální suspenze oproti 4 ml PBS denzitometrem. Postup byl opakován do dosažení optické denzity přibližně 1,0, která by měla odpovídat přibližné koncentraci $5 \cdot 10^9$ bakterií v 1 ml PBS.

Bakteriální suspenze byla rozdělena po 1 ml do plastových zkumavek a centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce. Pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml kultivačního média.

3.2.2.2 Příprava bakteriální suspenze zabité *F. tularensis* LVS

Na 4 plotny McLeod byla masivně naočkována bakterie *F. tularensis* LVS. Pak byla připravena, stejným způsobem jako v kapitole 3.2.2.1 bakteriální suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^9$ bakterií v 1 ml PBS a optické denzitě přibližně 1,0. Bakteriální suspenze byla centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce a k peletám byl přidán 1 ml 37% formaldehydu. Zkumavka s bakteriální suspenzí byla vložena do termostatu a inkubována 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinách byla zkumavka vyjmuta z termostatu a centrifugována 7 minut při 8 000 g. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce a pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml PBS.

Pro kontrolu životnosti bakterií byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze a nanesen na 2 plotny McLeod. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Zbývající množství bakteriální suspenze bylo rozděleno po 1 ml do plastových zkumavek a centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce. Pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml kultivačního média.

3.2.2.3 Výsev bakterií a odečet počtu kolonie tvořících jednotek CFU

Do osmi plastových zkumavek bylo napipetováno 450 µl PBS a zkumavky byly označeny řadou 10^{-1} až 10^{-8} . Do zkumavky s označením 10^{-1} bylo přeneseno pipetou 50 µl buněčně suspenze s optickou denzitou přibližně 1,0. Novou špičkou byla suspenze promíchána a odebráno 50 µl do zkumavky s označením 10^{-2} . Takto bylo pokračováno v celé řadě, čímž se docílilo ředění desítkovou řadou. Ze zkumavky s označením 10^{-7} a 10^{-8} bylo 50 µl přepipetováno na suché plotny McLeod a sterilní hokejkou opatrně rozetřeno do vsáknutí. Vše bylo prováděno duplicitně, byly spotřebovány 4 plotny McLeod. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 72 hodin při teplotě 37 °C.

Za 72 hodin byly spočítány všechny kolonie narostlé na každé plotně. Počet CFU v 1 ml bakteriální suspenze byl vypočítán podle vzorce:

počet kolonií na plotně x ředění 1 x ředění 2

ředění 1převrácená hodnota koncentrace (10^7 nebo 10^8)

ředění 21 000 µl / 50 µl = 20

3.2.3 Detekce genové exprese metodou RT-PCR

3.2.3.1 Pokus č. 1

Infekce a stimulace buněk

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci $5 \cdot 10^6$ buněk/ml. Podle kapitol 3.2.2.1 a 3.2.2.2 bylo připraveno potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^9$ živých bakterií/ml a $5 \cdot 10^9$ mrtvých bakterií/ml. MOI byla 500.

Buněčná linie Ramos byla infikována *F. tularensis* LVS, zabitou *F. tularensis* LVS nebo stimulována LPS (*E. coli*) a rekombinantním proteinem IglC po dobu 6 hodin, 12 hodin a 24 hodin. Ke stimulaci byl použit zásobní roztok LPS (*E. coli*) o koncentraci 1 mg LPS/ml PBS, výsledná koncentrace při stimulaci byla 20 µg/ml. Dále byl použit zásobní roztok rekombinantního proteinu IglC o koncentraci 5 ng/ml. Bylo pracováno duplicitně.

Infekce a stimulace buněk Ramos byla prováděna v kónických zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 2.

Tab. 2 Množství buněčné suspenze, bakteriálních buněk, LPS (*E. coli*) a IglC použitých pro infekci a stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	<i>F. tularensis</i> LVS	Zabitá <i>F. tularensis</i> LVS	LPS (<i>E. coli</i>)	IglC
Kontrolní buňky	1 ml	-	-	-	-
Infikované <i>F.t.</i> LVS	1 ml	500 µl	-	-	-
Infikované zabitou <i>F.t.</i> LVS	1 ml	-	500 µl	-	-
Stimulované LPS (<i>E. coli</i>)	1 ml	-	-	20 µl	-
Stimulované IglC	1 ml	-	-	-	5 µl

Zkumavky byly naplněny podle tabulky 2 a mírně pootevřené vloženy do termostatu a inkubovány 6 hodin při 37° C a 5 % CO₂.

Po 6 hodinách byly zkumavky vyjmuty z termostatu a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn do dezinfekce, pelety resuspendovány a bylo přidáno přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl s velkou opatrností úplně odstraněn pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou. Zkumavky byly pečlivě zavřeny a zamrazeny na -80 °C.

Doba infekce byla v následujících pokusech prodloužena na časový interval 12 a 24 hodin a postup byl zopakován. Suché pelety byly zmrazeny na -80 °C nebo použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit.

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit

Všechny kroky izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit byly provedeny za laboratorní teploty, která nesměla být během centrifugace nižší než 20 °C. Doporučené množství pro tuto metodu bylo 3 – 4 . 10⁶ buněk (nikdy ne více než 10⁷ buněk).

K rozmrazeným, suchým, buněčným peletám bylo ve sterilním boxu přidáno 600 µl směsi RLT pufru a β-merkptoethanolu (10 µl β-merkptoethanolu na 1 ml RLT pufru). Obsah zkumavky byl zamíchán pipetou a poté homogenizován pomocí injekční stříkačky s jehlou o průměru 0,9 mm. K lyzátům bylo přidáno 600 µl 70% ethanolu a obsahy zkumavek byly promíchány pipetou. 700 µl z každého vzorku bylo pipetou přeneseno do kolonky RNeasy mini column umístěných v plastových zkumavkách o objemu 2 ml. Zkumavky byly opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Z plastových zkumavek umístěných pod kolonkami byl odstraněn proteklý ethanol. Pokud byl objem vzorku větší než 700 µl, byl zbytek vzorku opět přenesen na kolonky, zkumavky opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Poté byl opět odstraněn proteklý ethanol. Ke vzorkům na kolonkách bylo přidáno 700 µl RW1 pufru, zkumavky byly opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Plastové zkumavky obsahující proteklý pufr byly odstraněny a nahrazeny čistými. Na kolonky bylo napipetováno 500 µl RPE pufru, zkumavky byly opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Kolonky RNeasy mini column byly umístěny na čisté plastové zkumavky s víčkem

o objemu 1,5 ml (které jsou součástí kitu). Na membrány kolonek bylo napipetováno 30 μ l Rnase⁻ vody, zkumavky byly uzavřeny a centrifugovány 1 minutu při více než 8 000 g. Pro zvýšení výtěžnosti byl ještě jednou zopakován eluční krok a na kolonku bylo napipetováno 30 μ l eluátu a centrifugováno 1 minutu při více než 8 000 g.

Poté bylo z každé zkumavky odebráno 5 μ l RNA pro měření na spektrofotometru a 5 μ l RNA pro měření kvality RNA na 1,2% agarózovém gelu (připravený z 10 \times FA gel pufu). Zbývající RNA byla zamrazena na -80 °C.

Měření množství a kvality RNA na spektrofotometru NanoPhotometer

Na spektrofotometru NanoPhotometer byla následujícím postupem změřena kvalita a koncentrace RNA v μ g/ μ l vzorku a bylo vypočteno množství izolované RNA, které bylo následně použito pro syntézu cDNA. Výpočet byl proveden trojčlenkou, vycházelo se z toho, že pro syntézu cDNA bylo potřeba 4 μ g RNA (Tab. 3).

Na terčík Nanodropu byly napipetovány 2 μ l RNA jednotlivých vzorků. Byla měřena hodnota poměru absorbancí při vlnové délce 230, 260 a 280 nm. Tyto hodnoty umožní hodnocení čistoty vzorku. Očekávané poměry 260/280 a 260/230 jsou 2,0 pro RNA. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Absorbance při 230 nm značí nečistoty, jako jsou karbohydráty, fenolické sloučeniny a aromatické složky. Jako slepý vzorek bylo použito 2 μ l RNease⁻ vody.

Tab. 3 Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
K 6	1,926	1,684	0,853	4,69
LVS 6	2,009	1,400	0,754	5,31
Killed 6	2,058	1,412	0,686	5,83
LPS Eco 6	2,046	1,501	0,718	5,57
IgIC 6	2,030	1,523	0,728	5,49
K 12	2,040	1,489	0,708	5,65
LVS 12	2,043	1,461	0,715	5,59
Killed 12	2,009	1,602	0,722	5,54
LPS Eco 12	2,022	1,468	0,739	5,41
IgIC 12	1,903	1,314	0,745	5,37
K 24	2,004	1,378	0,766	5,22
LVS 24	2,039	1,592	0,695	5,76
Killed 24	2,052	1,696	0,602	6,64
LPS Eco 24	2,022	1,394	0,745	5,37
IgIC 24	2,053	1,596	0,513	7,80

Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24 hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

IgIC 6, IgIC 12, IgIC 24 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IgIC po dobu 6, 12 a 24 hodin

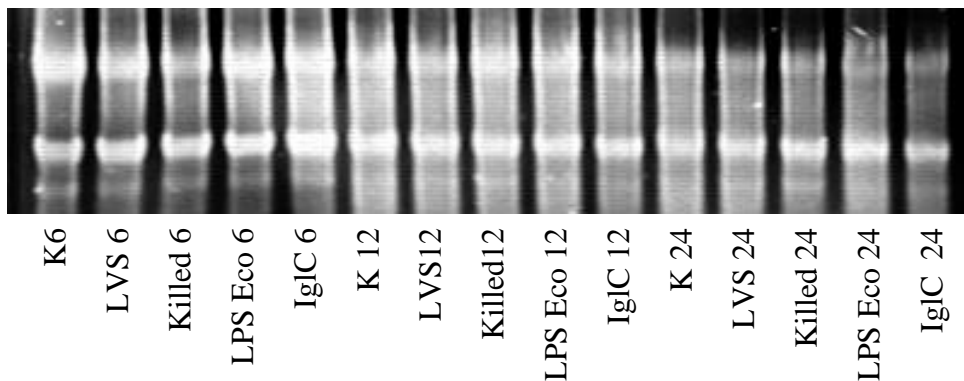
Hodnoty poměrů absorbancí 260/280 a 260/230 z tabulky 3 vypovídají o čistotě izolované RNA.

Sledování kvality RNA na gelu

Chemikálie na 1,2% agarózový gel byly zahřívány v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. Směs byla po vychladnutí přibližně na 65 °C vylita do připravené vaničky na gely s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel asi 30 minut equilibrován v 1× FA Gel Running Bufferu. Poté byl gel umístěn do elektroforetické vany naplněné 1× FA Gel Running Bufferem, do jednotlivých jamek bylo napipetováno 5 µl vzorku RNA smíchané s 1 µl glycerolu a s 2 µl Loading Bufferu. Elektroforéza byla prováděna po

dobu 30 minut při napětí 100 V. Jakmile skončila elektroforéza, byl gel 5 minut barven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 µg/ml a 15 minut odbarvován v deionizované vodě. Poté byl gel hodnocen pod UV lampou (Obr. 2). Hodnocení gelů se provádělo okometricky.

Obr. 2 Sledování kvality izolované RNA na 1,2% agarózovém gelu



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24 hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

IglC 6, IglC 12, IglC 24 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 6, 12 a 24 hodin

Eukaryotická RNA by měla být na gelu charakterizována dvěma silnými proužky o velikosti 4,7 kbp a 1,9 kbp. V jednotlivých sloupcích obrázku 2 jsou patrné separované RNA produkty o dané velikosti v podobě proužků. Tímto byla prokázána přítomnost a kvalita izolované RNA.

Syntéza cDNA

Při syntéze cDNA dochází k přepisu mRNA do cDNA.

Do PCR zkumavek umístěných na ledu byla napipetována směs vzorků RNA a RNease⁻ vody o celkovém objemu 20 µl. Pro reakci bylo použito 4 µg RNA od každého vzorku. Množství použité RNA v µl je uvedeno v tabulce 3. Ke každému

vzorku bylo přidáno 2 μl (100 μM) Oligo T18VN primeru a 2 μl dNTP mixu. Celkový objem jednoho vzorku tedy byl 24 μl . Směs byla promíchána a inkubována 5 minut při 65 °C v termocykleru.

Po skončení inkubace v termocykleru byly vzorky vyndány na led. Ke každému bylo přidáno 14 μl RT mixu, který obsahuje:

8,0 μl	5 \times First Strand Buffer
4,0 μl	DTT 0,1 M
2,0 μl	RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)

Vzorky byly promíchány a inkubovány 2 minuty při 37 °C v termocykleru.

Po skončení inkubace bylo ke každému vzorku přidáno 2 μl M-MLV reverzní transkriptázy, směs byla promíchána a inkubována při následujícím teplotním profilu:

37 °C	50 minut
70 °C	15 minut
4 °C	nekonečno

Vzorky cDNA lze uchovávat v lednici přibližně 1 týden. Aby nedošlo k jejich degradaci, byla část vzorků odebrána a zamrzena na -20 °C.

Amplifikace cDNA

Při amplifikaci cDNA dochází ke zmnožení specifického úseku cDNA pomocí primerů pro daný gen.

Do PCR zkumavek umístěných na ledu bylo napipetováno 20 μl PCR mixu a 5 μl směsi cDNA a RNase⁻ vody. Pro amplifikaci byla připravena také pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla připravena tisícinásobným zředěním ze vzorku pozitivního při dané amplifikaci. V negativní kontrole byla nahrazena cDNA 1,0 μl RNase⁻ vody. PCR mix obsahuje:

15,25 μl	RNase ⁻ vody
2,5 μl	Buffer IV, 10 \times koncentr.
1,0 μl	MgCl ₂ , 50 mM
0,5 μl	dNTP, 10 mM
0,25 μl	Primer Sense (0,1 mM)
0,25 μl	Primer Antisense (0,1 mM)
0,25 μl	Taq polymerase (5 U/ μl)

Vzorky byly promíchány a inkubovány v termocykleru při následujícím teplotním profilu, kroky 2 – 3 byly opakovány podle použitého primeru 24 až 40krát.

- | | |
|----------|-------------------------|
| 1. 95 °C | 10 minut |
| 2. 95 °C | 15 sekund |
| 3. 60 °C | 60 sekund („annealing“) |
| 4. 72 °C | 5 minut |
| 5. 4 °C | nekonečno |

Pro jednotlivé amplifikace bylo podle potřeby k optimalizaci měněno množství MgCl₂ v PCR mixu a teplota kroku 3 („annealing“, dochází k nasednutí primerů na templátovou cDNA).

Elektroforéza

Pro elektroforézu byly používány 2% agarózové gely. V mikrovlnné troubě byly rozvařeny 2 g agarózy ve 100 ml 0,5× TBE pufru. Roztok byl po vychladnutí nalit do vaničky na přípravu gelů s hřebínkem. Po odstranění vzniklých vzduchových bublin byl gel ponechán asi 30 minut tuhnout. Elektroforetická vana byla naplněna 0,5× TBE puforem a ztuhlý gel byl do ní přemístěn. Do jednotlivých jamek bylo opatrně napipetováno 10 µl vzorku smíšeného s kapičkou glycerolu a kapičkou Trackit Cyan/Orange Loading Buffer. Pro kontrolu velikosti vzorku byl do první jamky gelu vždy umístěn 1 kB DNA Ladder (marker molekulové hmotnosti), o objemu přibližně 4 µl, který byl v průběhu elektroforézy rozdělen po celé délce dráhy.

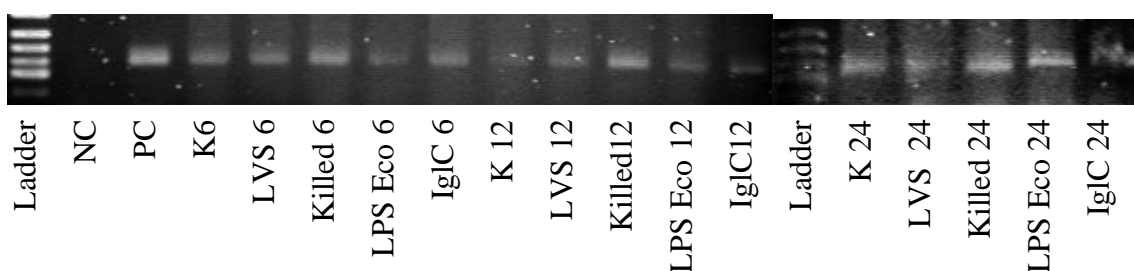
Vzorky byly na gel nanášeny ve standardním pořadí: DNA Ladder – negativní kontrola – pozitivní kontrola (pokud byla) – vzorky pro 6hodinový interval – vzorky pro 12hodinový interval – vzorky pro 24hodinový interval.

Elektroforéza byla prováděna po dobu 35 minut a napětí 100 V. Poté byl gel vyjmut, barven 5 minut v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 µg/ml (ethidium bromid se začlení do struktury DNA a umožní její detekci pod UV lampou) a 15 minut odbarvován v deionizované vodě (pro odstranění nespecifického barvení). Gel byl poté vyhodnocován pod UV lampou.

Standardizace na β_2 -mikroglobulin

Vzorky cDNA byly nejprve amplifikovány s použitím primeru pro gen pro β_2 -mikroglobulin. Tento gen je aktivní u všech buněk a slouží ke kvantitativní standardizaci exprese genů jednotlivých vzorků cDNA. Produktem byly stejně intenzivní proužky na gelu detekované UV lampou. Pokud proužky měly různou intenzitu, bylo upraveno množství cDNA použité k amplifikaci.

Obr. 3 Standardizace jednotlivých vzorků cDNA na β_2 -mikroglobulin, detekce produktů RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24 hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

IglC 6, IglC 12, IglC 24 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola

Obrázek 3 ukazuje, že výsledek byl pozitivní, proužky měly přibližně stejnou intenzitu (Obr. 3), proto byly objemy vzorků pro amplifikaci dalších genů připravovány s množstvím cDNA ve stejném poměru.

Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IFN- γ a TGF- β . Při amplifikaci byl měněn počet cyklů, tak aby byly výsledné produkty co nejvíce rozlišené.

3.2.3.2 Pokus č. 2

Infekce a stimulace buněk

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci $5 \cdot 10^6$ buněk/ml. Podle kapitol 3.2.2.1 a 3.2.2.2 bylo připraveno potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^9$ živých bakterií/ml a $5 \cdot 10^9$ mrtvých bakterií/ml. MOI byla 500.

Buněčná linie Ramos byla infikována *F. tularensis* LVS, zabitou *F. tularensis* LVS nebo stimulována LPS (*E. coli*) a LPS (*F. tularensis* LVS) po dobu 6 hodin, 12 hodin a 24 hodin. Pro stimulaci byl použit zásobní roztok LPS (*E. coli*) a zásobní roztok LPS (*F. tularensis* LVS). Oba o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace obou roztoků při stimulaci byla 20 µg/ml. Bylo pracováno duplicitně.

Infekce a stimulace buněk Ramos byla prováděna v kónických zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 4.

Tab. 4 Množství buněčné suspenze, bakteriálních buněk, LPS (*E. coli*) a LPS (*F.t*) použitých pro infekci a stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	<i>F. tularensis</i> LVS	Zabitá <i>F. tularensis</i> LVS	LPS (<i>E. coli</i>)	LPS (<i>F.t</i>)
Kontrolní buňky	1 ml	-	-	-	-
Infikované <i>F.t.</i> LVS	1 ml	500 µl	-	-	-
Infikované zabitou <i>F.t.</i> LVS	1 ml	-	500 µl	-	-
Stimulované LPS (<i>E. coli</i>)	1 ml	-	-	20 µl	-
Stimulované LPS (<i>F.t.</i>)	1 ml	-	-	-	20 µl

Zkumavky byly naplněny podle tabulky 4 a mírně pootevřené vloženy do termostatu a inkubovány 6 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Po 6 hodinách byly zkumavky vyjmuty z termostatu a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn do dezinfekce, pelety resuspendovány a přidáno přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl s velkou opatrností úplně odstraněn pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou. Zkumavky byly pečlivě zavřeny a zamrazeny na -80 °C.

Doba infekce byla v následujících pokusech prodloužena na časový interval 12 a 24 hodin a postup byl zopakován. Suché pelety byly zmrazeny na -80 °C nebo použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit.

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1.

Měření množství a kvality RNA na spektrofotometru NanoPhotometer

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1 (Tab. 5 na následující straně).

Tab. 5 Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
K 6	2,019	1,429	0,624	6,41
LVS 6	1,974	1,187	0,824	4,85
LPS Eco 6	1,933	0,822	0,706	5,67
LPS F.t. 6	1,967	1,554	0,779	5,13
Killed 6	1,994	1,373	0,771	5,19
K12	1,927	1,651	0,824	4,75
LVS 12	1,854	1,547	0,869	4,60
LPS Eco12	1,999	1,464	0,829	4,83
LPS F.t. 12	1,980	1,867	0,773	5,17
Killed 12	2,003	1,346	0,709	5,64
K 24	1,964	1,753	0,693	5,77
LVS 24	1,874	1,796	0,851	4,70
LPS Eco 24	2,034	1,142	0,671	5,96
LPS F.t. 24	1,935	0,959	0,708	5,65
Killed 24	1,981	1,566	0,716	5,59

Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12 LPS, Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS F.t. 6, LPS F.t. 12, LPS F.t. 24 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

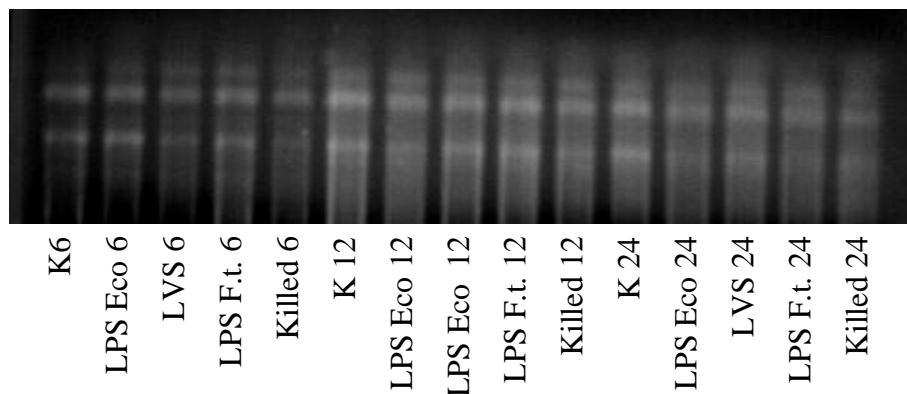
Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Hodnoty poměrů absorbancí 260/280 a 260/230 z tabulky 5 vypovídají o čistotě izolované RNA.

Sledování kvality RNA na gelu

Dále byla provedena kontrola kvality RNA na 1,2% agarózovém gelu v 1× FA Gel Running Bufferu stejně jako v pokusu č.1 (Obr.4).

Obr. 4 Sledování kvality izolované RNA na 1,2% agarózovém gelu



Vysvětlivky k obrázku 4 viz vysvětlivky k tabulce 5.

V jednotlivých sloupcích obrázku 4 byly patrné separované RNA produkty v podobě proužků o velikosti 4,7 kbp a 1,9 kbp. Tímto byla prokázána přítomnost a kvalita izolované RNA.

Syntéza cDNA

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1. Množství RNA pro syntézu je uvedeno v posledním sloupci tabulky 5.

Standardizace na β_2 -mikroglobulin

Ke standardizaci cDNA na β_2 -mikroglobulin byl použit 1 μ l cDNA, 4 μ l RNase⁻ vody a 20 μ l PCR mixu ve složení podle tabulky 6.

Tab. 6 Složení PCR mixu pro standardizaci na β_2 -mikroglobulin

RNase⁻ voda	15,25 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,00 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer pro β_2-mikroglobulin S (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer pro β_2-mikroglobulin AS (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

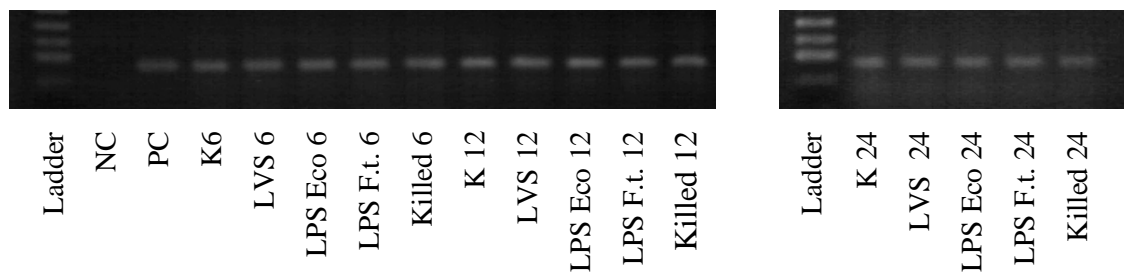
V negativní kontrole (NC) byla cDNA nahrazena 1 μ l RNase⁻ vody. Pozitivní kontrola (PC) byla zhotovena tisícinásobným zředěním ze vzorku, který byl pozitivní při předchozí amplifikaci.

Vzorky byly promíchány a inkubovány v termocykleru při následujícím teplotním profilu, kroky 2 – 3 byly opakovány 40krát (tj. po dobu 40 cyklů).

1. 95 °C 10 minut
2. 95 °C 15 sekund
3. 60 °C 60 sekund („annealing“)
4. 72 °C 5 minut
5. 4 °C nekonečno

Elektroforéza byla provedena stejně jako v pokusu č. 1, na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

Obr. 5 Standardizace jednotlivých vzorků na β_2 -mikroglobulin, detekce produktu RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12 LPS, Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS F.t. 6, LPS F.t. 12, LPS F.t. 24 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola

Obrázek 5 ukazuje, že výsledek byl pozitivní a proužky měly stejnou intenzitu (Obr. 5), proto byly vzorky pro amplifikaci dalších genů připravovány s množstvím cDNA 1 μ l (tzn. všechny ve stejném poměru).

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IL-10, IFN- γ a TGF- β . Vzorky pro amplifikaci byly připraveny s množstvím cDNA 1 μ l, RNase⁻ vody 4 μ l a 20 μ l PCR mixu. Při amplifikaci byl měněn počet cyklů, množství MgCl₂, popřípadě teplota kroku 3 (kdy dochází k nasednutí primerů na templátovou cDNA) tak, aby byly výsledné produkty co nejvíce rozlišené.

3.2.3.3 Pokus č. 3

Infekce a stimulace buněk

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci $5 \cdot 10^6$ buněk/ml. Podle kapitol 3.2.2.1 a 3.2.2.2 bylo připraveno potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^9$ živých bakterií/ml a $5 \cdot 10^9$ mrtvých bakterií/ml. MOI byla 500.

Buněčná linie Ramos byla infikována *F. tularensis* LVS, zabitou *F. tularensis* LVS nebo stimulována LPS (*F. t.*) a rekombinantním proteinem IglC po dobu 12 hodin, 24 hodin a 48 hodin. Ke stimulaci byl použit zásobní roztok LPS (*F. t.*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při stimulaci byla 20 µg/ml. Dále byl použit zásobní roztok rekombinantního proteinu IglC o výsledné koncentraci 20 µg/ml. Bylo zpracováno duplicitně.

Infekce a stimulace buněk Ramos byla prováděna v kónických zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 7.

Tab. 7 Množství buněčné suspenze, bakteriálních buněk, LPS (*F. t.*) a IglC použitých pro infekci a stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	<i>F. tularensis</i> LVS	Zabitá <i>F. tularensis</i> LVS	LPS (<i>F.t.</i>)	IglC
Kontrolní buňky	1 ml	-	-	-	-
Infikované <i>F.t.</i> LVS	1 ml	500 µl	-	-	-
Infikované zabitou <i>F.t.</i> LVS	1 ml	-	500 µl	-	-
Stimulované LPS (<i>F. tularensis</i>)	1 ml	-	-	20 µl	-
Stimulované IglC	1 ml	-	-	-	20 µl

Zkumavky byly naplněny podle tabulky a mírně pootevřené vloženy do termostatu a inkubovány 12 hodin při 37 °C a 5% CO₂.

Poté byly zkumavky pro 12hodinový interval vyjmuty a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn do dezinfekce a pelety resuspendovány přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Poté byl úplně odstraněn supernatant. Vzniklé pelety byly zamrazeny na -80 °C.

Doba infekce byla v následujících pokusech prodloužena na časový interval 24 a 48 hodin a postup byl zopakován. Suché pelety byly zmrazeny na -80 °C nebo použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit.

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1.

Měření množství a kvality RNA na spektrofotometru NanoPhotometer

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1 (Tab. 8).

Tab. 8 Kontrola kvality a koncentrace RNA

Označení vzorku	A _{260/280}	A _{260/230}	Koncentrace RNA (µg/µl)
K 12	2,000	1,649	0,049
LVS 12	2,102	0,582	0,041
IglC 12	2,036	0,983	0,046
LPS Eco 12	2,000	1,402	0,054
Killed 12	2,055	1,911	0,120
K 24	2,058	0,743	0,043
LVS 24	2,073	2,041	0,159
IglC 24	2,063	0,983	0,046
LPS F.t. 24	1,930	1,733	0,122
Killed 24	2,048	2,246	0,120
K 48	2,096	1,122	0,096
LVS 48	1,933	1,217	0,070
IglC 48	2,065	0,700	0,064
LPS F.t. 48	2,061	1,788	0,081
Killed 48	2,050	2,050	0,114

Vysvětlivky:

K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IglC 12, IglC 24, IglC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 12, 24 a 48 hodin

LPS Eco 12*, LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 12, 24 a 48 hodin

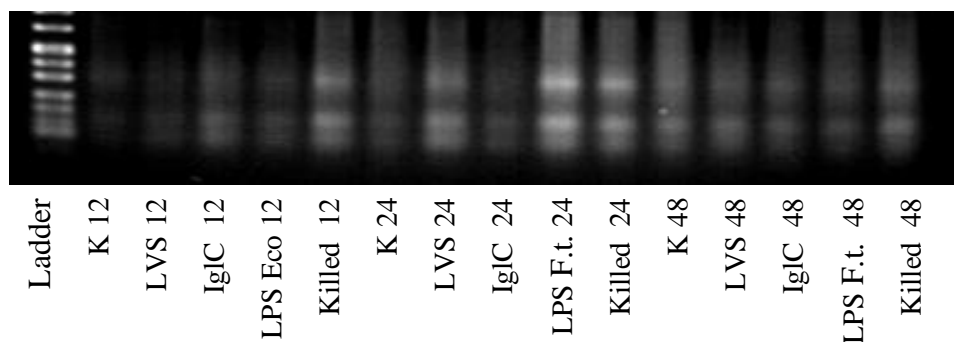
Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

* Ke stimulaci buněk byl ve 12hodinovém intervalu použit LPS (*E.coli*) namísto LPS (*F. tularensis*). I přes tuto chybu bylo pokračováno v tomto pokusu.

Sledování kvality RNA na gelu

Dále byla provedena kontrola kvality RNA na 1,2% agarózovém gelu v 1× FA Gel Running Bufferu stejně jako v pokusu č.1 (Obr. 6).

Obr. 6 Sledování kvality izolované RNA na 1,2% agarózovém gelu



Vysvětlivky k obrázku 6 viz vysvětlivky k tabulce 8.

V jednotlivých sloupcích obrázku 6 jsou patrné separované RNA produkty v podobě proužků o velikosti 4,7 kbp a 1,9 kbp. Je ovšem viditelný velký rozdíl v intenzitě proužků mezi jednotlivými sloupci, to poukazuje na rozdíly v koncentraci mezi jednotlivými vzorky (dokládá to také tabulka 8).

Syntéza cDNA

Bylo postupováno stejným způsobem jako v pokusu č. 1. Množství RNA pro syntézu – protože změřená koncentrace RNA byla hodně nízká, pro syntézu cDNA bylo použito veškeré množství a doplněno RNease⁻ vodou tak, aby celkový objem jednoho vzorku činil 20 μ l. Objem cDNA používaný k amplifikaci pro jednotlivé geny byl standardizován na β_2 -mikroglobulin (Obr. 7 a Obr. 8) a je uveden v tabulce 10.

Amplifikace cDNA

Bylo postupováno obdobným způsobem jako v pokusu č. 1. Pro jednotlivé amplifikace bylo podle potřeby měněno množství MgCl₂ v PCR mixu (a tím pádem i RNease⁻ vody) a teplota „annealingu“.

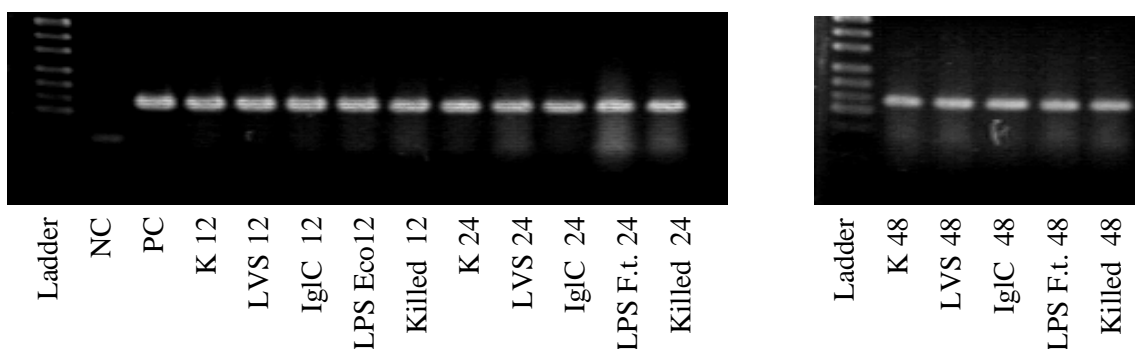
Standardizace na β_2 -mikroglobulin

Ke standardizaci cDNA na β_2 -mikroglobulin byl použit 1 μ l cDNA, 4 μ l RNase⁻ vody a 20 μ l PCR mixu ve složení podle tabulky 9. Při teplotě „annealing“ 60 °C bylo amplifikováno po dobu 40 cyklů (Obr. 7). V negativní kontrole (NC) byla cDNA nahrazena 1 μ l RNase⁻ vody. Pozitivní kontrola (PC) byla zhotovena tisícinásobným zředěním ze vzorku, který byl pozitivní při předchozí amplifikaci. Elektroforéza byla provedena stejně jako v pokusu č. 1, na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

Tab. 9 Množství komponent pro přípravu PCR mixu (pro standardizaci na β_2 -mikroglobulin)

RNase⁻ voda	14,45 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,80 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer pro β_2-mikroglobulin S (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer pro β_2-mikroglobulin AS (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

Obr. 7 Standardizace jednotlivých vzorků cDNA na β_2 -mikroglobulin I., 40 cyklů, detekce produktu RT-PCR.



K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IglC 12, IglC 24, IglC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 12, 24 a 48 hodin

LPS Eco 12, LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS po dobu 12, 24 a 48 hodin

Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin.

NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola

Podle rozdílů v intenzitě mezi jednotlivými proužky na obrázku 7 bylo odhadnuto množství cDNA (Tab. 10), které bylo používáno k amplifikaci cDNA pro jednotlivé geny, a bylo ověřeno opět na genu pro β_2 -mikroglobulin po dobu 38 cyklů (Obr. 8).

Tab. 10 Množství cDNA, RNase⁻ vody a PCR mixu pro amplifikaci β_2 -mikroglobulinu II. a následně i dalších genů

Označení vzorku	Množství cDNA (μ l)	Množství RNase ⁻ vody (μ l)	Množství PCR mixu
K 12	1,00	4,00	20,0
LVS 12	1,00	4,00	20,0
IglC 12	1,00	4,00	20,0
LPS Eco 12	1,00	4,00	20,0
Killed 12	0,70	4,30	20,0
K 24	1,00	4,00	20,0
LVS 24	0,50	4,50	20,0
IglC 24	1,00	4,00	20,0
LPS F.t.24	0,70	4,30	20,0
Killed 24	0,70	4,30	20,0
K 48	0,80	4,20	20,0
LVS 48	0,80	4,20	20,0
IglC 48	0,75	4,25	20,0
LPS F.t.48	0,80	4,20	20,0
Killed 48	0,70	4,30	20,0

Vysvětlivky:

K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

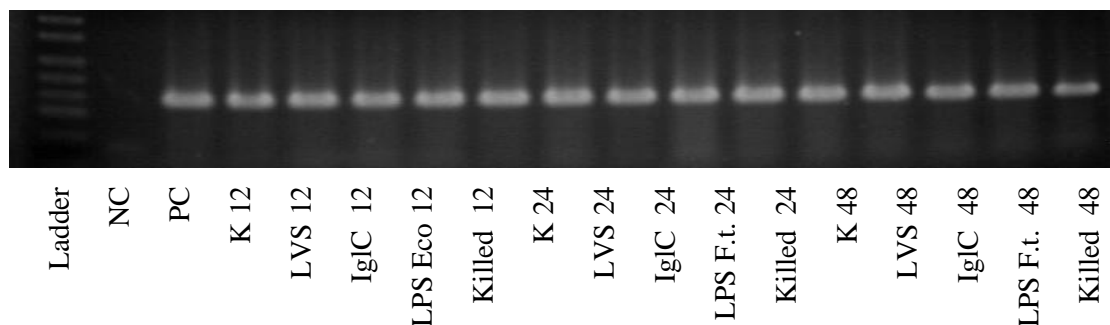
LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IglC 12, IglC 24, IglC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 12, 24 a 48 hodin

LPS Eco 12, LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 12, 24 a 48 hodin

Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

Obr. 8 Standardizace jednotlivých vzorků cDNA na β_2 -mikroglobulin II., 38 cyklů, detekce produktu RT-PCR



Vysvětlivky k obrázku 8 viz vysvětlivky k předchozí tabulce (Tab. 10).

Výsledek byl pozitivní a proužky měly stejnou intenzitu (Obr. 8), proto byly vzorky pro amplifikaci dalších genů připravovány s množstvím cDNA, RNase⁻ vody a PCR mixu ve složení podle podle tabulky 10.

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IL-10, TGF- β a TNF- α . Vzorky pro amplifikaci byly připraveny s množstvím cDNA a RNase⁻ vody podle Tab. 10 a ke všem bylo přidáváno 20 μ l PCR mixu. Při amplifikaci byl měněn počet cyklů, množství MgCl₂, popřípadě teplota kroku 3 tak, aby byly výsledné produkty co nejvíce rozlišené.

4 Výsledky

4.1 Pokus č. 1

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

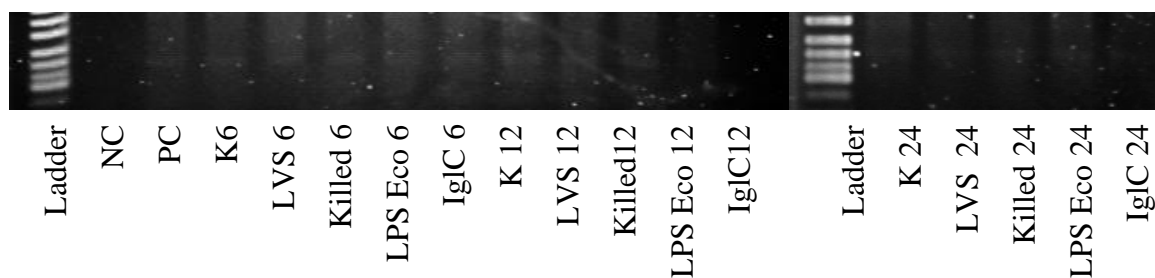
Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IFN- γ a TGF- β . Vzorke pro amplifikaci byly připraveny s množstvím cDNA 1 μ l, RNase⁻ vody 4 μ l a 20 μ l PCR mixu (složení podle tabulky 11).

Tab. 11 Množství komponent pro přípravu PCR mixu

RNase⁻ voda	15,25 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,00 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer Sense (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer Antisense (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

Gen pro IFN- γ byl nejprve amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 9).

Obr. 9 Detekce genu pro IFN- γ , 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24 hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

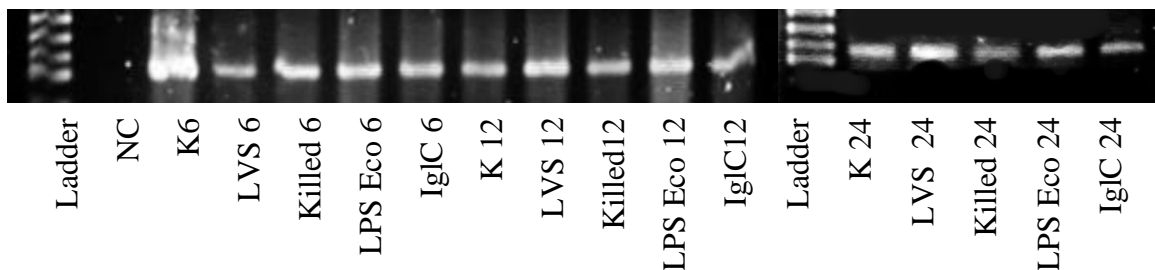
LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

IglC 6, IglC 12, IglC 24 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola

Výsledek byl negativní, protože se na gelu neobjevil žádný proužek. S největší pravděpodobností to byl důsledek použití malého množství cDNA. Amplifikace byla opakována a množství cDNA zvýšeno na 3 μ l (Obr. 10).

Obr. 10 Detekce genu pro IFN- γ , 40 cyklů II. Produkt RT-PCR.

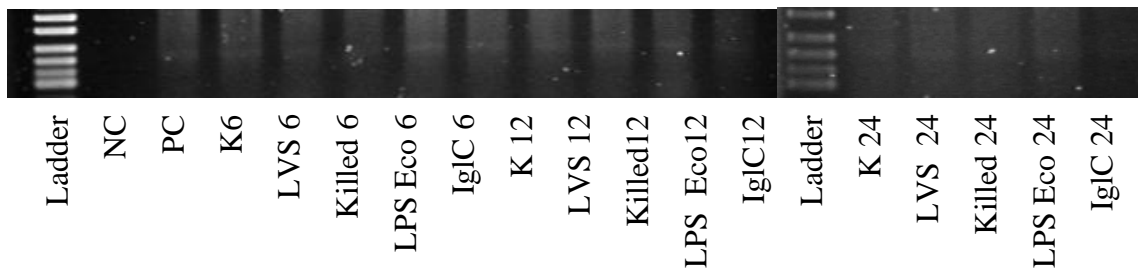


Vysvětlivky k obrázku 10 viz předchozí obrázek 9.

Byla detekována zvýšená exprese genu pro IFN- γ u B buněk po infekci *F. tularensis* LVS. V 6hodinovém intervalu nebylo možné zhodnotit (okometrické hodnocení) genovou expresi vzhledem k buňkám kontrolním, protože jejich exprese byla v tomto časovém intervalu z neznámých příčin extrémně vysoká. Ve 12hodinovém intervalu byla exprese genu v porovnání s buňkami kontrolními zvýšená a ve 24hodinovém intervalu byl patrný rozdíl exprese ještě vyšší.

Gen pro TGF- β byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 11). K amplifikaci byly použity 2 μ l cDNA.

Obr. 11 Detekce genu pro TGF- β , 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24 hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

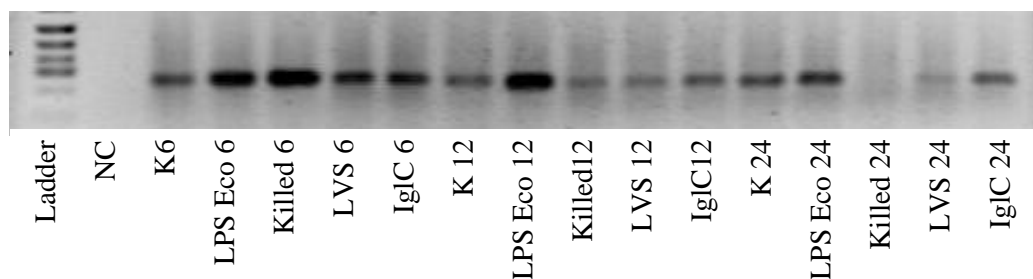
LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

IglC 6, IglC 12, IglC 24 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola

Výsledek byl negativní, protože se na gelu neobjevil žádný proužek. S největší pravděpodobností to byl důsledek použití malého množství cDNA jako v předchozím případě. Amplifikace byla opakována a množství cDNA zvýšeno na 3 μ l (Obr. 12).

Obr. 12 Detekce genu pro TGF- β , 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky k obrázku 12 viz obrázek 11.

Expresce genu pro TGF- β byla zvýšená u B buněk infikovaných zabitou *F. tularensis* LVS v 6hodinovém intervalu. Ve 12hodinovém a 24hodinovém intervalu se naopak s časem snižovala ve srovnání s buňkami kontrolními. Expresce tohoto genu byla po stimulaci B buněk rekombinantním proteinem Ig1C v 6hodinovém intervalu mírně zvýšená, ve 12hodinovém a 24hodinovém shodná s kontrolními buňkami.

4.2 Pokus č. 2

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

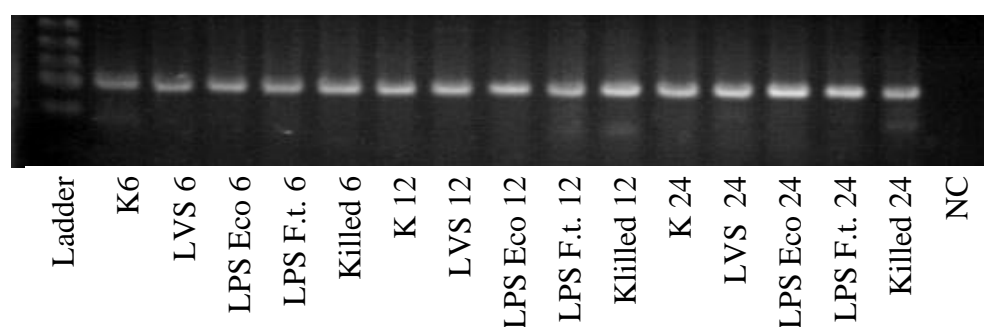
Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IL-10, IFN- γ a TGF- β . Vzorky pro amplifikaci byly připraveny s množstvím cDNA 1 μ l, RNase⁻ vody 4 μ l a 20 μ l PCR mixu.

Tab. 12 Množství komponent pro přípravu PCR mixu

RNase⁻ voda	15,25 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,00 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer Sense (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer Antisense (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

Gen pro IL-10 byl amplifikován po dobu 40 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. K amplifikaci bylo použito 1 μ l cDNA, 4 μ l RNase⁻ vody a 20 μ l PCR mixu ve složení podle tabulky 12. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku v následujícím pořadí (Obr. 13).

Obr. 13 Detekce genu pro IL-10, 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

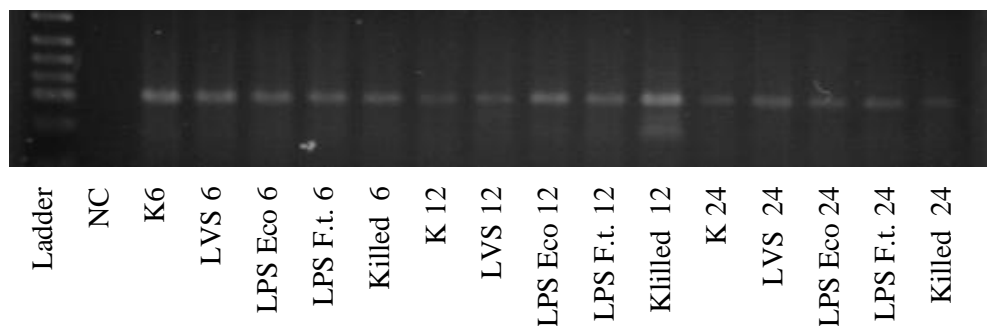
LPS F.t. 6, LPS F.t. 12, LPS F.t. 24 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola

Z obrázku 13 je patrné, že jednotlivé amplikony se příliš nelišily v intenzitě, proto byla amplifikace zopakována a počet cyklů snižen na 35 (Obr. 14).

Obr. 14 Detekce genu pro IL-10, 35 cyklů. Produkt RT-PCR.

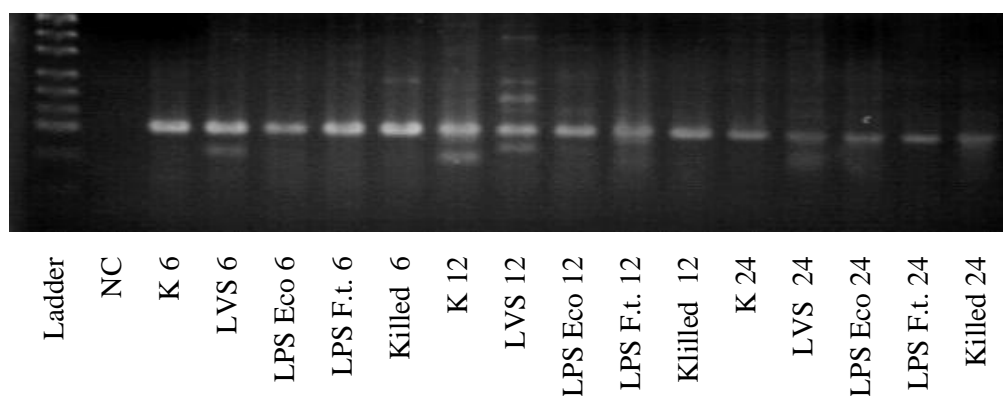


Vysvětlivky k obrázku 14 viz obrázek 13.

Z obrázku je patrné podle intenzity proužků, že exprese genu pro IL-10 byla zvýšená oproti kontrolním buňkám jen v případě, že byly B buňky infikovány zabitou *F. tularensis* LVS, popř. stimulovány LPS (*E. coli*) a LPS (*F. tularensis*) po dobu 12 hodin.

Gen pro IFN- γ byl amplifikován po dobu 40 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. K amplifikaci bylo použito 1 μ l cDNA, 4 μ l RNase⁻ vody a 20 μ l PCR mixu ve složení podle tabulky 12. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku (Obr. 15).

Obr. 15 Detekce genu pro IFN- γ , 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky k obrázku 15:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12 LPS, Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

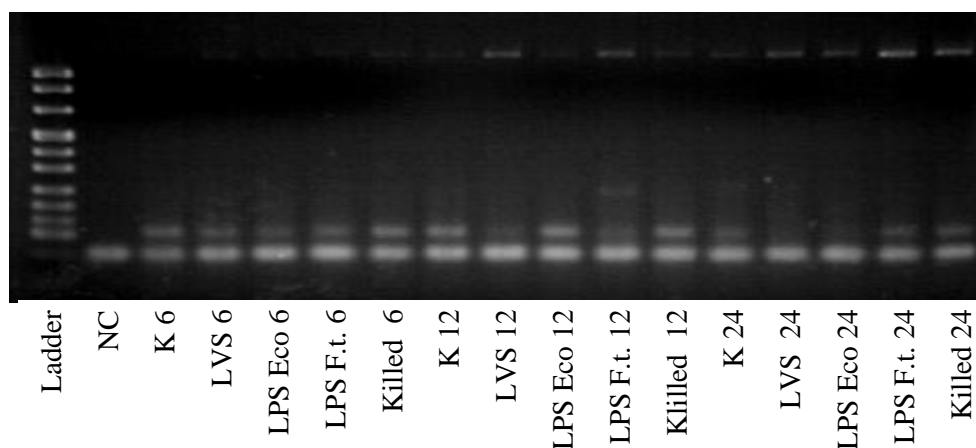
LPS F.t. 6, LPS F.t. 12, LPS F.t. 24 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola

Z obrázku 15 je patrné, že došlo ke vzniku nespecifických produktů (na obrázku se jeví jako tenké proužky navíc k očekávaným produktům), proto byl gen pro IFN- γ amplifikován znovu. Byl snížen počet cyklů na 38 a změněno množství $MgCl_2$ na 1,2 μl a množství RNase⁻ vody na 15,05 μl v PCR mixu (Obr. 16).

Obr. 16 Detekce genu pro IFN- γ , 38 cyklů. Produkt RT-PCR.



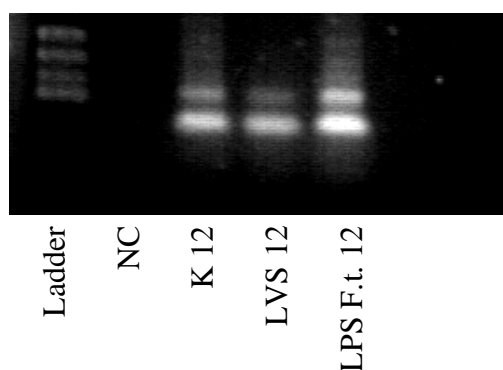
Vysvětlivky k obrázku 16 viz obrázek 15.

Po provedení detekce amplikonů (Obr. 16) byly opět viditelné slabé proužky u některých vzorků, proto byla opakována amplifikace po dobu 40 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C s vybranými vzorky K12, LVS 12 a LPS F.t. 12. Množství použité cDNA bylo pokaždé 1 μl , množství $MgCl_2$ a RNase⁻ vody v PCR mixu podle tabulky 13 (Obr. 17).

Tab. 13 Množství MgCl₂ a RNase⁻ vody

Označení vzorku	Množství 50 mM MgCl ₂ (μl)	Množství RNase ⁻ vody (μl)
K12	1,5	14,75
LVS 12	2,0	14,25
LPS F.t. 12	2,5	13,75

Obr. 17 Detekce genu pro IFN-γ, 40 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 12 – kontrolní buňky po 12hodinové inkubaci

LVS 12 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12hodin

LPS F.t. 12 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 12 hodin

NC – negativní kontrola

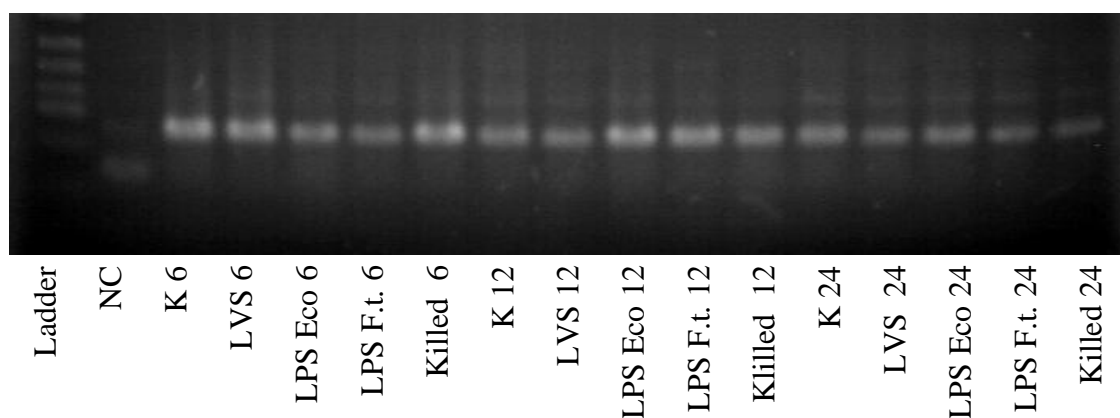
Na obrázku 17 jsou opět patrné nespecifické reakce. Vlivem časté manipulace s primery pro IFN-γ došlo zřejmě k jejich degradaci nebo poškození.

Gen pro TGF-β byl amplifikován po dobu 34 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. K amplifikaci byl použit 1 μl cDNA a 20 μl PCR mixu ve složení podle tabulky 14 (Obr. 18).

Tab. 14 Množství komponent PCR mixu k amplifikaci genu pro TGF- β

RNase⁻ voda	14,45 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,80 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer Sense (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer Antisense (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

Obr. 18 Detekce genu pro TGF- β , 34 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

LVS 6, LVS 12, LVS 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS Eco 6, LPS Eco 12, LPS, Eco 24 – buňky stimulované LPS (*E. coli*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

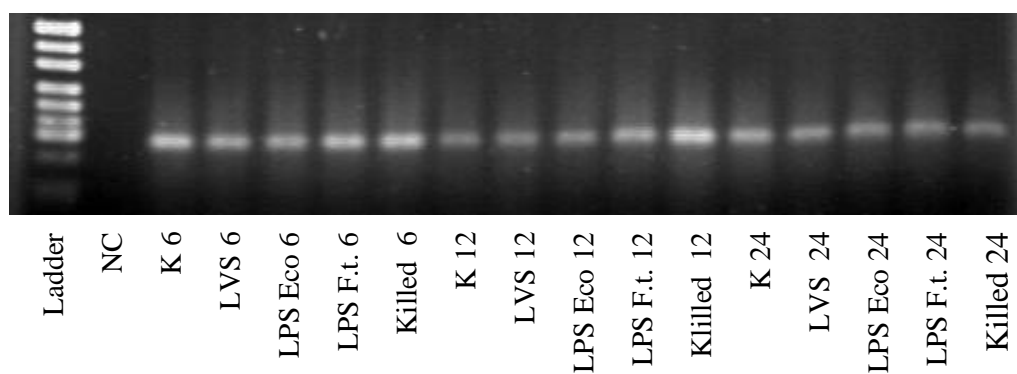
LPS F.t. 6, LPS F.t. 12, LPS F.t. 24 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

NC – negativní kontrola

Obrázek 18 - po provedení detekce amplikonů byly viditelné slabé nespecifické reakce a rozlišení jednotlivých proužků nebylo zřetelné. Amplifikace byla proto zopakována po dobu 24 cyklů (Obr. 19).

Obr. 19 Detekce genu pro TGF- β , 24 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky k obrázku 19 viz obrázek 18.

Z obrázku je zřejmé, že exprese genu pro TGF- β byla zvýšená ve 12hodinovém intervalu u B buněk infikovaných zabitou *F. tularensis* LVS v porovnání s buňkami stimulovanými LPS (*F. tularensis*).

4.3 Pokus č. 3

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

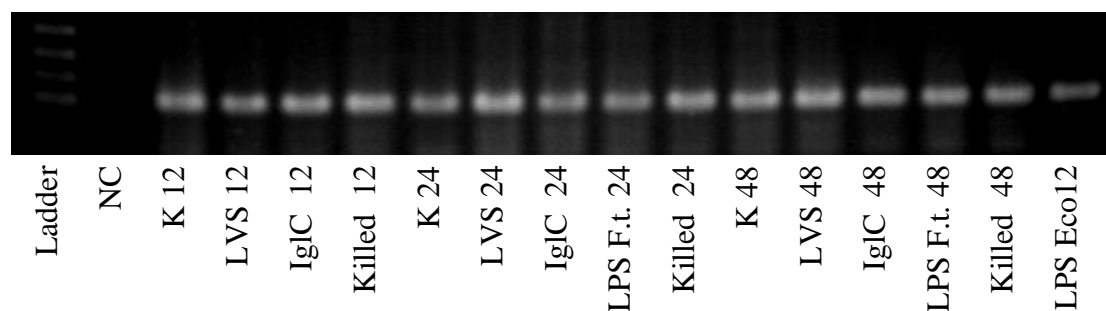
Ke standardizované cDNA byly přidávány primery pro IL-10, TGF- β a TNF- α . Vzorke pro amplifikaci byly připraveny s množstvím cDNA a RNase⁻ vody podle tabulky 10 (str. 53) a 20 μ l PCR mixu podle tabulky 15.

Gen pro IL-10 byl amplifikován po dobu 35 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku v daném pořadí. Pro lepší rozlišení intenzity jednotlivých proužků byla amplifikace zopakována při 32 a 28 cyklech (Obr. 20, 21 a 22).

Tab. 15 Množství komponent PCR mixu

RNase⁻ voda	15,25 μ l
Buffer IV, 10\times konc.	2,50 μ l
MgCl₂, 50 mM	1,00 μ l
dNTP, 10 mM	0,50 μ l
Primer Sense (0,1 mM)	0,25 μ l
Primer Antisense (0,1 mM)	0,25 μ l
Taq polymerase (5 U/μl)	0,25 μ l

Obr. 20 Detekce genu pro IL-10, 35 cyklů. Produkt RT-PCR.



K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IglC 12, IglC 24, IglC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 12, 24 a 48 hodin

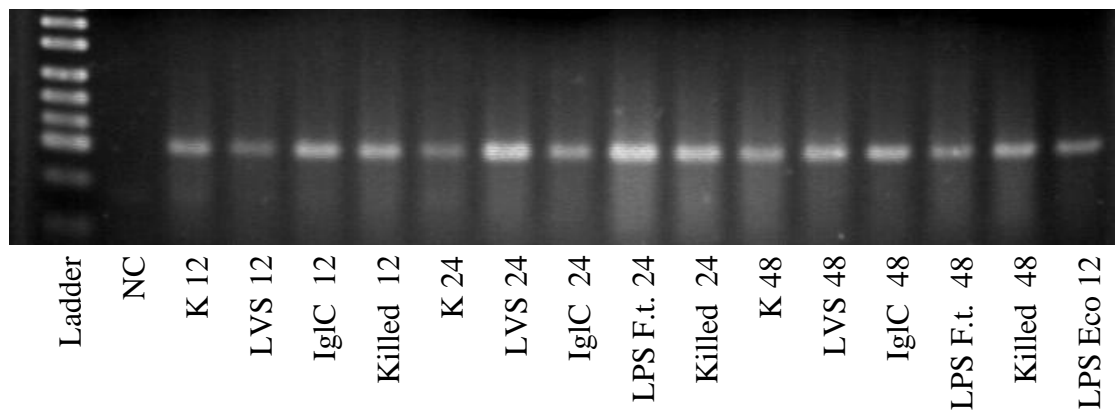
LPS Eco 12, LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS po dobu 12, 24 a 48 hodin

Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

NC – negativní kontrola

Na obrázku 20 je vidět, že amplifikace proběhla správně, ale protože jednotlivé proužky měly podobnou intenzitu, byla amplifikace zopakována a počet cyklů snížen na 32.

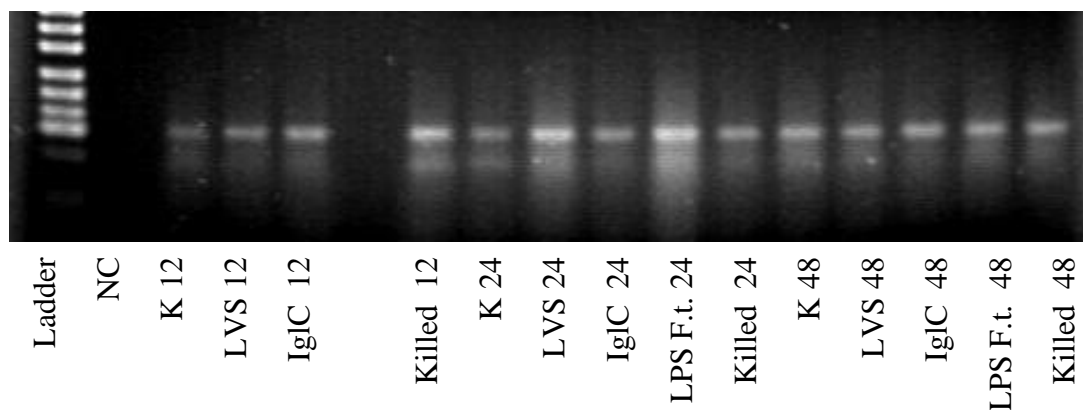
Obr. 21 Detekce genu pro IL-10, 32 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky k obrázku 21 viz obrázek 20.

Na obrázku 21 je opět vidět, že amplifikace proběhla správně, ale pro ještě lepší rozlišení jednotlivých proužků byla amplifikace naposledy zopakována a počet cyklů snížen na 28 (Obr 22).

Obr. 22 Detekce genu pro IL-10, 28 cyklů. Produkt RT-PCR.



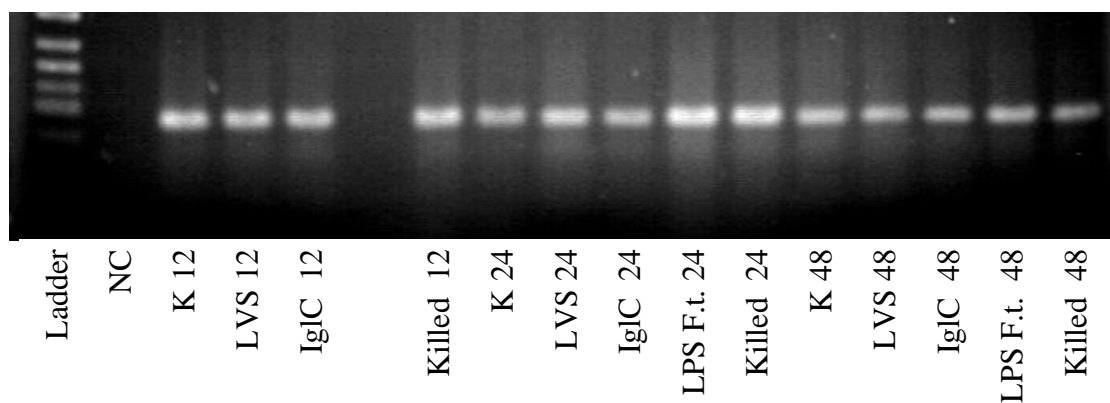
Vysvětlivky k obrázku 22 viz obrázek 20.

Obrázek 22 dokazuje, že optimální amplifikace u genu pro IL-10 byla při teplotě „annealing“ 60 °C a po dobu 28 cyklů, kdy byl rozdíl v intenzitě jednotlivých proužků největší.

Z obrázku 22 je patrné, že exprese genu pro IL-10 po stimulaci B buněk rekombinantním proteinem IglC byla ve 12hodinovém intervalu mírně zvýšená, ve 24hodinovém a 48hodinovém intervalu shodná s buňkami kontrolními.

Gen pro TGF- β byl amplifikován po dobu 28 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. K amplifikaci bylo použito cDNA a RNase⁻ vody podle tabulky 10 (str. 53) a 20 μ l PCR mixu podle tabulky 15. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku v daném pořadí. Pro lepší rozlišení intenzity jednotlivých proužků byla amplifikace zopakována při 24 cyklech (Obr. 23 a 24).

Obr. 23 Detekce genu pro TGF- β , 28 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky:

K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IglC 12, IglC 24, IglC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IglC po dobu 12, 24 a 48 hodin

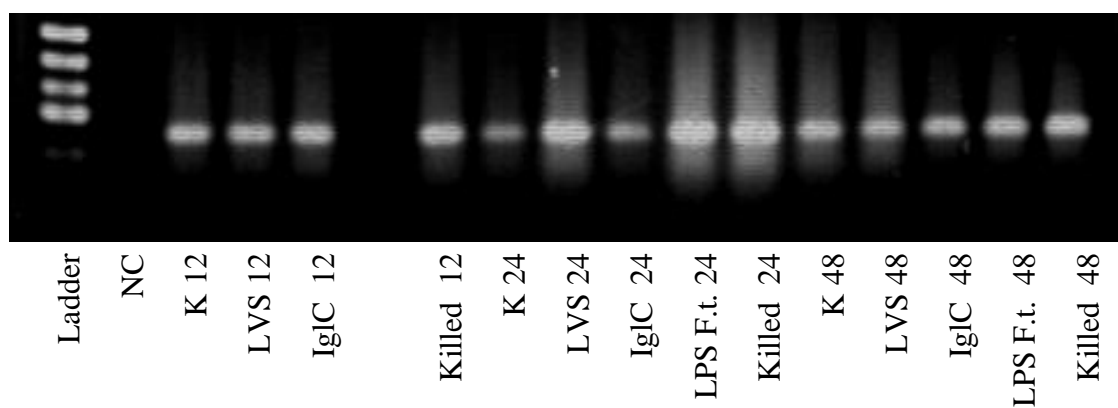
LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS (*F. tularensis*) po dobu 24 a 48 hodin

Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

NC – negativní kontrola

Na obrázku 23 je vidět, že amplifikace proběhla správně, ale pro ještě lepší rozlišení jednotlivých proužků byla amplifikace zopakována a počet cyklů sniženo na 24 (Obr. 24).

Obr. 24 Detekce genu pro TGF- β , 24 cyklů. Produkt RT-PCR.

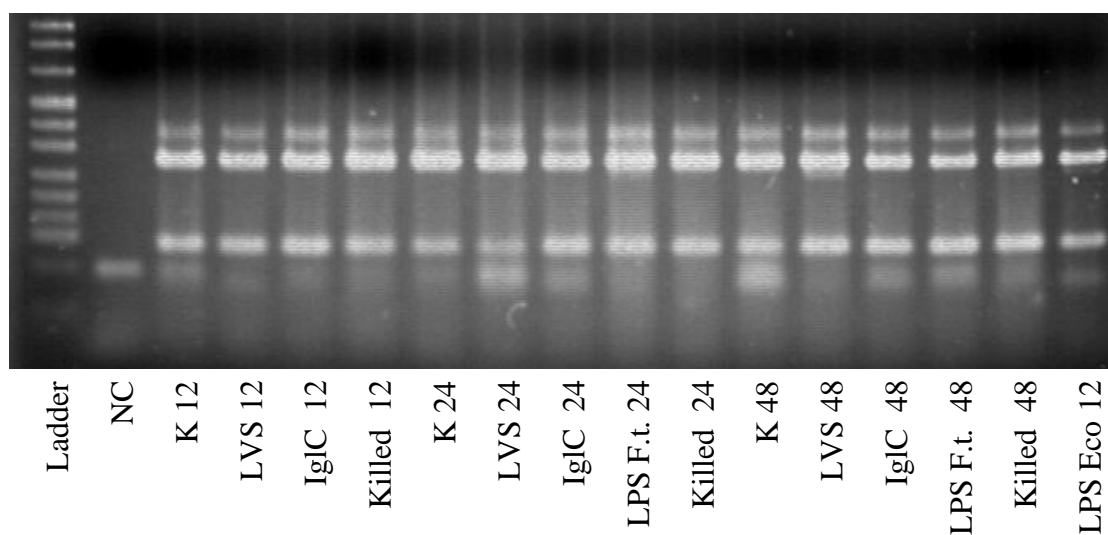


Vysvětlivky k obrázku 24 viz obrázek 23.

Expresa genu pro TGF- β po stimulaci B buněk rekombinantním proteinem IgIC byla ve 12hodinovém, 24hodinovém a 48hodinovém intervalu shodná s kontrolními buňkami.

Gen pro TNF- α byl amplifikován po dobu 38 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C. K amplifikaci bylo použito cDNA, RNase⁻ vody a PCR mixu v množství podle tabulky 10 a tabulky 15. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku v daném pořadí.

Obr. 25 Detekce genu pro TNF- α , 38 cyklů. Produkt RT-PCR.



Vysvětlivky k obrázku 25:

K 12, K 24, K 48 – kontrolní buňky po 12, 24 a 48hodinové inkubaci

LVS 12, LVS 24, LVS 48 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

IgIC 12, IgIC 24, IgIC 48 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IgIC po dobu 12, 24 a 48 hodin

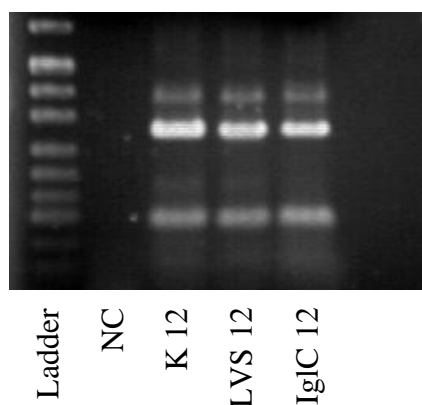
LPS Eco 12, LPS F.t. 24, LPS F.t. 48 – buňky stimulované LPS po dobu 12, 24 a 48 hodin

Killed 12, Killed 24, Killed 48 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* LVS po dobu 12, 24 a 48 hodin

NC – negativní kontrola

Výsledné amplikony na obrázku 25 neodpovídají očekávaným produktům, proto byl gen pro TNF- α opět amplifikován a to po dobu 38 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C s vybranými vzorky K12, LVS 12 a IgIC 12. Množství použité cDNA a množství MgCl₂ v PCR mixu podle tabulky 16 (Obr. 26).

Obr. 26 Detekce TNF- α , 38 cyklů **Tab. 16** Množství MgCl₂ a RNase⁻ vody



Označení vzorku	Množství cDNA(μl)	Množství 50 mM MgCl ₂ (μl)	Množství RNase ⁻ vody (μl)
K12	1,0	1,5	14,75
LVS 12	1,0	2,0	14,25
IgIC 12	1,0	2,5	13,75

Vysvětlivky:

K 12– kontrolní buňky po 12hodinové inkubaci

LVS 12 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 12hodin

IgIC 12 – buňky stimulované rekombinantním proteinem IgIC po dobu 12hodin

NC – negativní kontrola

Amplikony pozorované na obrázku 26 neodpovídají předpokládaným produktům. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“ 55 a 50 °C, výsledné produkty opět neodpovídaly očekávaným. Tento primer se nepodařilo z časových důvodů zoptimalizovat.

5 Diskuse

F. tularensis je intracelulární gramnegativní bakterie, která způsobuje onemocnění označované jako tularemie. Tato bakterie je vysoce infekční a díky svým vlastnostem je uvedena na seznamu šesti nejnebezpečnějších potenciálních biologických zbraní. Ačkoliv její patogeneze je studována od konce 60. let minulého století, dosud není zcela objasněna. Jako u ostatních intracelulárních patogenů byla představa, že *F. tularensis* infikuje makrofágy, ty prezentují její antigeny a spouští na buňkách závislou imunitní odpověď. Během let studia její patogeneze se však ukázalo, že po vstupu do makrofágů uniká z membránou obalené vakuoly do cytosolu, kde se množí a poté vstupuje do autofagozómu. Bylo také zjištěno, že neaktivuje makrofágy k časné produkci prozánětlivých cytokinů, ale naopak jsou zablokovány všechny signální cesty vedoucí k aktivaci nukleárního faktoru κB a tím i produkce prozánětlivých cytokinů. Podobně jako u makrofágů je po internalizaci bakterií zablokována aktivace NF κB také u dendritických buněk. Pro kontrolu a zvládnutí infekce *in vivo* je nezbytná přítomnost IFN- γ a TNF- α . Během časné fáze infekce jsou hlavním zdrojem IFN- γ NK buňky a produkci tumor nekrotizujícího faktoru zabezpečují pravděpodobně keratinocyty (Ellis, 2002). Po dlouhou dobu se předpokládalo, že B buňky nehrají v imunitní odpovědi k *F. tularensis* žádnou roli. Až koncem 90. let byly publikovány práce, které prokázaly, že B buňky mají nezastupitelné místo v časné fázi primární a sekundární odpovědi (Culkin, 1997). V minulém desetiletí byly pak publikovány práce prokazující účast specifických anti-tularemických protilátek na ochraně hostitele v průběhu infekce *F. tularensis* (Stenmark 2003, 2004; Savitt, 2009).

Cílem mé práce bylo zjistit, jak se mění exprese genů kódujících molekuly cytokinů u B buněčné linie vlivem infekce *F. tularensis* LVS a vlivem stimulace bakteriálním rekombinantním proteinem IgIC a *F. tularensis* LPS. Navázala jsem na diplomovou práci Bc. Lenky Kasmanové, která největší část své práce věnovala optimalizaci podmínek a ověřování kvality primerů na vzorcích ovlivněných LPS (*E.coli*). U vzorků infikovaných *F. tularensis* LVS se podařilo zoptimalizovat geny pro IFN- γ a IL-12. Byla pozorována zvýšená exprese genu pro IFN- γ , která rostla s časem a také zvýšená exprese genu pro IL-12 ve 24hodinovém intervalu. V poslední části optimalizace jsem se již na získaných výsledcích podílela společně s Bc. Lenkou Kasmanovou.

K pokusům bylo využito metody reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce. Vzorky RNA byly nejdříve izolovány pomocí RNeasy Mini Kit.

Kontrola výtěžnosti a kvality získané RNA byla měřena na spektrofotrickém přístroji NanoPhotometer (Implen). Z naměřené koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) bylo následně vypočítáno množství izolované RNA potřebné pro syntézu cDNA. V pokusu č. 3 byla změřená koncentrace RNA velice nízká. Nižší výtěžnost může být obecně způsobena nedokonalou homogenizací a lyzou buněk během izolace RNA, nebo zpracováním vzorků s nízkým množstvím RNA nebo překročením množství výchozího materiálu následované neúplným rozpadem materiálu a interferencí s vazbou RNA do membrány kolonky (http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/RNeasy_Mini_Handbook.pdf). I přes velmi nízký výtěžek bylo v pokusu pokračováno, k syntéze cDNA bylo použito veškeré množství izolované RNA. Objem cDNA, který byl následně používán k amplifikaci genů, byl standardizován na β_2 -mikroglobulin. Kvalita izolovaných vzorků RNA je dána hodnotou podílu absorbance $A_{260/280}$, pro čistou RNA by měla být kolem 2,0, a hodnota $A_{260/230}$ pro nukleové kyseliny v rozmezí 2,0 – 2,2. Hodnoty podílů u naměřených vzorků nasvědčovaly, že jsou kvalitní.

Imunitní odpověď k patogenům velmi často vyžaduje jak na B buňkách závislou humorální složku odpovědi, tak na T buňkách závislou buněčnou odpověď. CD4+ T buňky se jednoznačně podílejí na humorální odpovědi aktivací B buněk cytokiny, které T lymfocyty produkují. Avšak potencionální zapojení B buněk v buněčné odpovědi bylo donedávna odmítáno. Za posledních 10 let však byla publikována řada prací podávající důkazy, že efektorové a regulační populace B buněk modulují T buňky prezentováním antigenů, kostimulací a produkcí cytokinů, které řídí proliferaci a efektorové funkce T buněk. Ačkoliv je v současné době publikována řada prací, které jasně dokazují, že B buňky se produkcí cytokinů podílejí na modulaci imunitní odpovědi, je zatím ještě málo známo o faktorech, které regulují cytokinovou produkci. Jak uvádí Duddy *et al.* (2004), profil cytokinů produkovaných B buňkami závisí na signálních cestách aktivovaných buď BCR nebo CD40. Pokud dojde ke stimulaci obou receptorů, dojde k sekreci TNF- α , lymphotoxinu a IL-6, což může působit jako autokrinní stimulace a zesilovat tak imunitní odpověď, pokud však dojde k signalizaci pouze přes CD40, tzn. bez specifického rozpoznání antigenu, prozánětlivé cytokiny nejsou produkovány, dojde k zvýšené sekreci cytokinu IL-10, což má za následek supresi imunitní odpovědi. Tento mechanismus – spouštění imunitní odpovědi pouze

v případě rozpoznání cizího antigenu – vede k ochraně hostitelského organismu. Přesto, že B buňky produkují hlavně IL-6, IL-10, LT- α a TNF- α , byly v poslední době publikovány práce prokazující produkci i jiných cytokinů jako IL-2, IL-4, IFN- γ a IL-12. Autoři Harris *et al.* (2000) identifikovali dvě populace tzv. efektorových B buněk (Be1 a Be2), které produkují různé typy cytokinů v závislosti na cytokinovém prostředí, ve kterém jsou buňky stimulovány během jejich prvním setkání s antigenem. Tyto populace efektorových B buněk regulují pak diferenciaci naivních CD4 T lymfocytů na Th1 a Th2 subpopulace díky polarizaci produkce cytokinů jako IL-4 a IFN- γ . Interferon gamma produkovaný B buňkami se navíc ukázal jako induktor produkce IFN- γ NK buňkami (Matsumoto, 2006) a tím se B buňky zařadily jako důležitá složka časné, přirozené imunitní odpovědi.

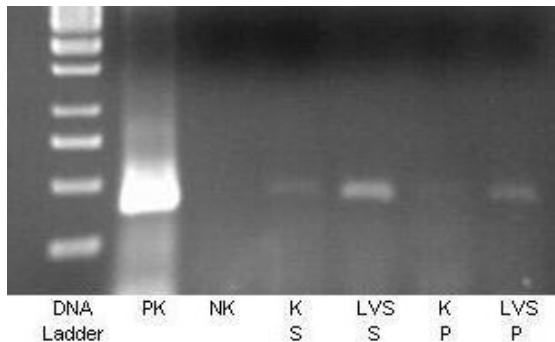
IFN- γ je cytokin, který je nepostradatelný pro vrozenou i adaptivní imunitní odpověď. Jeho role je rozhodující v kontrole proti virovým a intracelulárním bakteriálním infekcím a nádorovému bujení. Tento interferon je produkován makrofágy, dendritickými buňkami a NK buňkami velmi časně po infekci jako součást primární odpovědi a ovlivňuje polarizaci T0 buněk na Th1 větev. Navíc je tento cytokin nezbytný pro kontrolu infekce způsobenou *F. tularensis*.

V našem pokusu byla detekována zvýšená exprese genu pro IFN- γ u B buněk po infekci *F. tularensis* LVS. Ve 6hodinovém intervalu nebylo možné zhodnotit genovou expresi vzhledem k buňkám kontrolním, protože jejich exprese byla v tomto časovém intervalu z neznámých příčin extrémně vysoká. Ve 12hodinovém intervalu byla exprese genu v porovnání s buňkami kontrolními zvýšená a ve 24hodinovém intervalu B buněk po infekci *F. tularensis* LVS byl patrný rozdíl exprese ještě vyšší. Tento pokus byl proveden ve spolupráci s Bc. Lenkou Kasmanovou. Během dalších pokusů se nepodařilo detekovat kvalitní amplikony genů pro IFN- γ , bylo to zřejmě způsobeno primery, které vlivem časté manipulace degradovaly.

Zvýšená exprese genů pro IFN- γ byla na pracovišti ÚMP v poslední době potvrzena (předběžné výsledky L. Živné) i po *ex vivo* infekci. Myši BALB/c byly infikovány i.p. dávkou 10^2 *F. tularensis* LVS/myš. Za 24 hodin byl proveden peritoneální výplach a připraveny slezinné buňky. Na průtokovém cytometru Aria II byly vytrženy buňky CD19+ přímo do lyzačního roztoku TRIZOL a následně

provedena RT-PCR. Jak je patrné z oskenovaného gelu (Obr. A) došlo ke zvýšené expresi IFN- γ genu jak u slezinných tak peritoneálních CD19⁺ buněk.

Obrázek A Expres genu pro IFN- γ u slezinných a peritoneálních CD19⁺ buněk (převzato od: Živná L., dosud nepublikovaná data)



Vysvětlivky:

PK - pozitivní kontrola, NK - negativní kontrola, K - kontrolní buňky, S - slezinné a P - peritoneální buňky CD19⁺

Další z genů, jejichž expresi se nám podařilo zoptimalizovat, je gen pro IL-10. IL-10 je hlavní protizánětlivý cytokin produkovaný monocyty, makrofágy, Th2 lymfocyty, B buňkami a mastocyty. Vykazuje pleiotropní účinky v regulaci imunity a zánětu. Inhibuje syntézu kostimulačních molekul působících na MHC II. třídy a makrofágy a je schopen snižovat expresi prozánětlivých cytokinů produkovaných Th1 lymfocyty. Účinek IL-10 přispívá k regulaci proliferace a diferenciaci B buněk a produkci protilátek (Moore, 1993).

Expres genu pro IL-10 byla zvýšena oproti kontrolním buňkám jen v případě, že byly buňky Ramos infikovány zabitou *F. tularensis*, popř. stimulovány LPS *E. coli* a LPS *F. tularensis* po dobu 12 hodin. Zvýšená expres protizánětlivého cytokinu IL-10 u těchto stimulací může souviset s faktem, že po infekci myší mrtvou bakterií či tularemickým LPS nedochází ke klasické imunitní odpovědi.

TGF- β je 25 kDa multipotentní cytokin, který se různými způsoby podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a zánětlivých procesech. Je důležitý pro regulaci jak CD25⁺ T lymfocytů (CD25 je receptor pro IL-2), tak pro Th17 buňky. TGF- β ale blokuje aktivaci lymfocytů a monocytů fagocytujícími buňkami. V případě aerogenní infekce *F. tularensis* dochází v plicích k supresi produkce prozánětlivých cytokinů

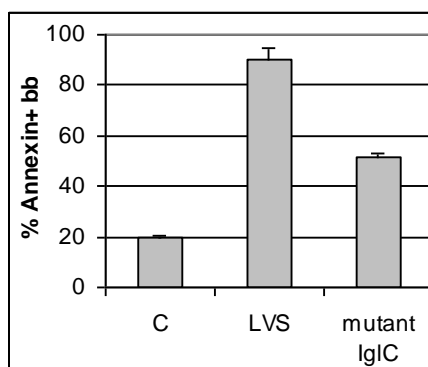
TNF- α a IL-6 a naopak dochází k zvýšené produkci TGF- β buňkami obsaženými v bronchoalveolární laváži (Bosio, Dow, 2005).

Expresce genu pro TGF- β byla zvýšená u B buněk infikovaných zabitou *F. tularensis* v 6hodinovém intervalu. Ve 12hodinovém a 24hodinovém intervalu se naopak s časem snižovala ve srovnání s buňkami kontrolními. Je pravděpodobné, že zvýšená expresce genu pro TGF- β , podobně jako je pro protizánětlivý IL-10, je příčinou zablokované imunitní odpovědi.

F. tularensis je patogenní díky tomu, že dokáže uniknout z fagozómu fagocytujících buněk a následně se pomnožit v cytosolu. Jako klíčové k úniku bakterie z fagozómu se jeví dva bakteriální operony oblasti označované ostrovy patogenity *mglAB* a *iglABCD*. *Igl* operon kóduje proteiny IglA, IglB, IglC a IglD, transkripce těchto proteinů je pozitivně regulována proteinem MglA. Bylo prokázáno použitím mutovaných bakteriálních kmenů, že proteiny MglA, IglC a IglD se přímo či nepřímo podílejí na blokaci acidifikace fagozómu a jsou nutné pro únik *F. tularensis* z fagozómu. Protein IglC je v bakteriálním světě strukturálně unikátní. Bylo prokázáno, že mutantní kmen *F. tularensis* Δ *iglC* není schopen uniknout z fagozómu, stejně jako Δ *iglD* a Δ *mglA*, a je uvězněn ve fagozómu. Po čase je na povrchu fagozómu, obsahující mutovaný kmen pro gen *iglC*, exprimován katepsin D, což prokazuje fúzi fagozómu s lysozómem (Santic, 2005; Bonquist, 2008).

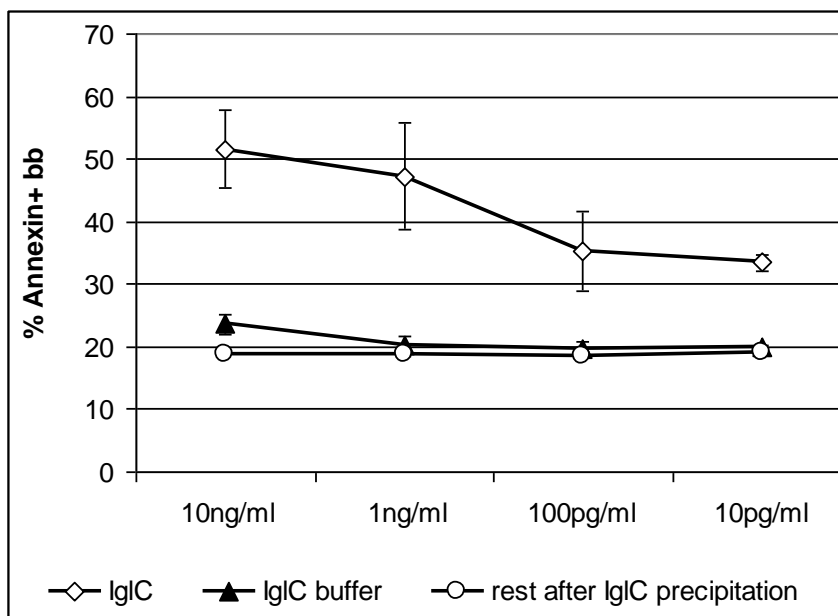
Kročová *et al.* (dosud nepublikovaná data) prokázali snížení apoptózy u B buněk po infekci *F. tularensis* s deletovaným genem *iglC* (Δ *iglC*) a zvýšení apoptózy u buněk stimulovaných r-IglC. Buňky Ramos byly infikovány divokým kmenem *F. tularensis* LVS a mutovaným kmenem s deletovaným genem pro IglC (Obr. B). Po 48 hodinách byla u buněk změřena expresce vně membrány lokalizovaného fosfatidylserinu, jako apoptického markeru, pomocí průtokové cytometrie. Z výsledků vyplývá, že mutovaný kmen snižuje procento apoptických buněk oproti kmeni divokému. V dalších pokusech byly buňky Ramos RA-1 inkubovány s rekombinantním proteinem IglC a expresce proapoptického markeru byla srovnávána s buňkami kultivovanými v pufru, ve kterém byl IglC rozpuštěn, a s buňkami ovlivněnými zbytkem pufru po imunoprecipitaci IglC. Z obrázku C je zřejmé, že samotný protein IglC je schopný vyvolat apoptózu a to v závislosti na koncentraci proteinu.

Obrázek B Procento apoptických buněk Ramos po 24hodinové infekci divokým kmenem *F. tularensis* LVS a mutovaným kmenem IglC (převzato od: Kročová, dosud nepublikovaná data).



Vysvětlivky: osa x: C - kontrolní B buňky, LVS - buňky infikované *F. tularensis* LVS, mutant IglC - buňky infikované *F. tularensis* s deletovaným genem *igIC*; osa y: apoptotické B buňky v %

Obrázek C Procento apoptických buněk Ramos po inkubaci s rekombinantním proteinem IglC, ve srovnání s pufrům a zbytkem po precipitaci proteinu (převzato od: Kročová, dosud nepublikovaná data).



Vysvětlivky:

osa x - koncentrace proteinu IglC, osa y – apoptotické B buňky v %

IglC - B buňky inkubované s rekombinantním proteinem IglC

IglC buffer - B buňky kultivované v pufru, ve kterém byl IglC rozpuštěn

rest after IglC precipitation - B buňky ovlivněné zbytkem pufru po imunoprecipitaci IglC

Expresce genu pro IFN- γ po stimulaci B buněk rekombinantním proteinem IglC byla v našem pokusu během časových intervalů neměnná a shodovala se s kontrolními buňkami. Expresce genu pro TGF- β byla v 6hodinovém intervalu mírně zvýšená, ve 12hodinovém, 24hodinovém a 48hodinovém intervalu shodná s kontrolními buňkami. Expresce genu pro IL-10 byla ve 12hodinovém mírně zvýšená, ve 24hodinovém a 48hodinovém intervalu shodná s buňkami kontrolními. Tyto výsledky se v podstatě shodují s těmi, které byly zjištěny v případě mrtvé *F. tularensis*, popř. jejího LPS a dávají předpoklad, že ani tento protein nebude v prvních fázích imunitní odpovědi k *F. tularensis* jako iniciátor aktivace imunokompetentních buněk.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo metodou reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce zjistit, jak se mění exprese genů kódujících molekuly cytokinů u B buněčné linie Ramos RA-1 vlivem infekce *F. tularensis* a vlivem stimulace bakteriálním rekombinantním proteinem IglC a lipopolysacharidem.

Přes velké problémy technického rázu se podařilo zjistit změny v expresi tří cytokinových genů u B buněčné linie Ramos RA-1 po infekci jak živou, tak usmrcenou *F. tularensis* LVS a po stimulaci buněk bakteriálním lipopolysacharidem a rekombinantním proteinem IglC.

Byla detekována zvýšená exprese genu pro IFN- γ u B buněk po infekci *F. tularensis* LVS. Exprese genu pro IL-10 byla zvýšená oproti kontrolním buňkám po infekci B buněk zabitou *F. tularensis*, popř. po stimulaci LPS *E. coli* a LPS *F. tularensis* po dobu 12 hodin. Exprese genu pro TGF- β byla zvýšená u B buněk infikovaných zabitou *F. tularensis* v 6hodinovém intervalu. Ve 12hodinovém a 24hodinovém intervalu se naopak exprese genu pro TGF- β s časem snižovala ve srovnání s buňkami kontrolními. Je pravděpodobné, že zvýšená exprese genu pro TGF- β , podobně jako je pro protizánětlivý IL-10, je příčinou zablokované imunitní odpovědi. Podobně jako živá bakterie ani rekombinantní protein IglC neindukuje u B buněčné linie Ramos imunitní odpověď.

Z výsledků naší práce vyplývá, že podobně jako u dalších buněk imunitního systému, jako jsou makrofágy či dendritické buňky, i u B buněk dokáže živá bakterie zablokovat signální cesty vedoucí k protizánětlivé imunitní odpovědi.

7 Abstrakt

Francisella tularensis je fakultativně intracelulární bakterie způsobující onemocnění tularemii různých druhů savců včetně člověka. Je schopná infikovat fagocytující i nefagocytující buňky. V naší práci jsme se zaměřili na studium B buněk, jejichž úloha v infekci *F. tularensis* byla dlouhou dobu opomíjena. Za posledních 10 let však byly publikovány práce, které poukazují na zapojení B buněk v časně imunitě proti *F. tularensis*.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak se mění exprese genů kódujících molekuly cytokinů u B buněk vlivem infekce *F. tularensis* a vlivem stimulace bakteriálním rekombinantním proteinem IglC a lipopolysacharidem. Tyto změny jsme zkoumali na B buněčné linii Ramos RA-1. Metodou reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce jsme detekovali geny pro cytokiny IFN- γ , IL-10 a TGF- β .

Klíčová slova: *Francisella tularensis*, B buňky, cytokiny, reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce

8 Abstract

Francisella tularensis is a facultative intracellular bacterium causing disease tularemia of different species of mammals, including humans. It is able to infect phagocytotic as well as non-phagocytotic cells. We focused on the study of B cells, that role in the infection of *F. tularensis* have been, until recently, regarded as not significant. Over the last 10 years several studies showed important role of B cells in innate immunity to *F.tularensis* infection.

The aim of this thesis was to identify changes in the expression of genes that encode molecules of cytokines produced by B cells, after *F. tularensis* infection, due to stimulation with bacterial recombinant protein IgIC and lipopolysaccharide. These changes were examined on B cell line Ramos RA-1. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction, we detected these cytokines: IFN- γ , IL-10 and TGF- β .

Key words: *Francisella tularensis*, B cells, cytokines, reverse transcriptase polymerase chain reaction

9 Použité zkratky

AcpA	Acid phosphatase, kyselá fosfatáza
ASC	Apoptosis-associated Speck-line Protein Containing a Caspase Recruitment Domain
AIF	Apoptosis-inducing Factor, apoptózu vyvolávající faktor
Apaf-1	Apoptosis Proteases-activating Factor 1, adaptorová molekula sloužící k aktivaci kaspázy 9
BCR	B cell Receptor, B buněčný receptor
BTK	Burton's Tyrosine Kinase, Burtonova tyrosin kináza
C3	Complement 3, C3 složka komplementu
CD	Cluster of Designation, diferenciační antigen
CFU	Colony-forming Unit, kolonie tvořící jednotky
CR3	Complement receptor 3, komplementový receptor 3
DISC	Death Cell Initializing Signaling Complex, smrt-indukující signalizační komplex
Eco	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, ethylendiamintetraoctová kyselina
EEA1	Early Endosomal Antigen 1, časný endozomální antigen 1
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
F. t.	<i>Francisella tularensis</i>
FCP	<i>F. tularensis</i> -containing Phagosome, fagozóm obsahující <i>F. tularensis</i>
FCV	<i>F. tularensis</i> -containing Vacuole, vakuola obsahující <i>F. tularensis</i>
FPI	<i>Francisella</i> Pathogenicity Island, tularemický ostrov patogenicity

HLA	Human Leukocyte Antigens, povrchové antigeny bílých krvinek u lidí
i.p.	intraperitoneální podání
IFN	interferon
igl	Intracellular Growth Locus, lokus pro intracelulární růst
IL	interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
IRAK	IL-1R-associated Kinase, kináza asociovaná s receptorem pro IL-1
IRF 3	Interferon Regulatory Factor 3, interferonem regulovaný faktor 3
JNK	c-Jun N-terminal Kinase, c-Jun N-terminální kináza
LAMP	Lysosomal-associated Membrane Protein, membránový protein asociovaný s lysozomy
LPS	lipopolysacharid
LT- α	lymphotoxin α
LVS	Live Vaccine Strain, živý vakcinační kmen
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase, mitogenem aktivovaná proteinkináza
mg1	Macrophage Growth Locus, lokus pro růst v makrofázích
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus, Moloneyho myší leukemický virus
MOI	Multiplicity of Infection, multiplicita infekce
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 3-(N-morfolin)propansulfonová kyselina
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NF κ B	Nuclear Factor kappa B, nukleární faktor kappa B

NK	Natural Killer, přirozený zabíječ
NO	Nitric oxide, oxid dusnatý
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PBS	Phosphate-buffered Saline, pufovaný fyziologický roztok
r-IgIc	rekombinantní protein IgIc
RNA	Ribonucleic Acid, kyselina ribonukleová
Rnase ⁻ voda	Rnase Free Water, voda prostá enzymů degradujících RNA
RP 105	Radioprotective Protein 105 kDa
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
TGF- β	Transforming Growth Factor, transformující růstový faktor
Th	Helper T-cell, pomocný lymfocyt
TIRAP	Toll/IL-1R Domain-containing Adaptor Protein
TLR	Toll-like Receptor, receptor skupiny Toll
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α , tumor nekrotizující faktor α
TRAF6	TNF-receptor Associated Factor 6, faktor 6 asociovaný s receptorem pro TNF
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

10 Použité zdroje

Balagopal, A., MacFarlane, A.S., Mohapatra, N., et al. „Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages.“ *Infection and Immunity*, 2006: 74(9): 5114-25.

Bonquist, L., Lindgren, H., Golovliov, I., et al. „MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages.“ *Infection and Immunity*, 2008: 76(8): 3502-10.

Bosio, C.M., Dow, S.W. „*Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells.“ *The Journal of Immunology*, 2005: 175(10): 6792-801.

Clemens, D.L., Horwitz, M.A. „Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages.“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007: 1105: 160-86.

Clemens, D.L., Lee, B.Y., Horwitz, M.A. „*Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops.“ *Infection and Immunity*, 2005: 73(9): 5892-902.

Clemens, D.L., Lee, B.Y., Horwitz, M.A. „Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages.“ *Infection and Immunity*, 2004: 72(6): 3204-17.

Cole, L.E., Laird, M.H., Seekatz, A. et al. „Phagosomal retention of *Francisella tularensis* results in TIRAP/Mal-independent TLR2 signaling.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 2010: 87(2): 275-81.

Cole, L.E., Santiago, A., Barry, E., et al. „Macrophage proinflammatory response to *Francisella tularensis* live vaccine strain requires coordination of multiple signaling pathways.“ *The Journal of Immunology*, 2008: 180(10): 6885-91.

Collazo, C.M., Sher, A., Meierovics, A.I., Elkins, K.L. „Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is essential for control of primary in vivo *Francisella tularensis* LVS infection, but not for control of intra-macrophage bacterial replication.“ *Microbes and Infection*, 2006: 8(3): 779-90.

Cross, J.T., Jacobs, R.F. „Tularemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone.“ *Clinical Infectious Diseases*, 1993: 17(6): 976-80.

Culkin, S.J., Rhinehart-Jones, T., Elkins, K. L. „A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS.“ *The Journal of Immunology*, 1997: 158(7): 3277-84.

Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., et al. „Tularemia as a biological weapon: medical and public health management.“ *The Journal of the American Medical Association*, 2001: 285(21): 2763-73.

Dreisbach, V.C., Cowley, S., Elkins, K.L. „Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon.“ *Infections and Immunity*, 2000: 68(4): 1988-96.

Duddy, M.E., Alter, A., Bar-Or, A. „Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?“ *The Journal of Immunology*, 2004: 172(6): 3422-7.

Dueñas, A.I., Aceves, M., Orduña, A., et al. „*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.“ *International Immunology*, 2006: 18(5): 785-95.

Ellis, J., Oyston, P.C., Green, M., Titball, R.W. „Tularemia.“ *Clinical Microbiology Reviews*, 2002: 15(4): 631-46.

Enderlin, G., Morales, L., Jacobs, R.F., Cross, J.T. „Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature.“ *Clinical Infectious Diseases*, 1994: 19(1): 42-7.

Forslund, A.L., Kuoppa, K., Svensson, K., et al. „Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*.“ *Molecular Microbiology*, 2006: 59(6):1818-30.

Fortier, A.H., Green, S.J., Polsinelli, T., et al. „Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage.“ *The Immunology Series*, 1994: 60: 349-61.

Gavrilin, M.A., Bouakl, I.J., Knatz, N.L., et al. „Internalization and phagosome escape required for *Francisella* to induce human monocyte IL-1beta processing and release.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006: 103(1): 141-6.

Gill, V., Cunha, B.A. „Tularemia pneumonia.“ *Seminars in Respiratory Infections*, 1997: 12(1): 61-7.

Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., et al. „An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells.“ *Infection and Immunity*, 2003: 71(10): 5940-50.

Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C. „Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells.“ *Nature Immunology*, 2000: 1(6): 475-82.

Hrstka, R., Krocova, Z., Cerny, J., et al. „*Francisella tularensis* strain LVS resides in MHC II-positive autophagic vacuoles in macrophages.“ *Folia Microbiologica*, 2007: 52(6): 631-6.

Hrstka, R., Stulík, J., Vojtesek, B. „The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages.“ *Microbes Infect*, 2005: 7(4): 619-25.

Jia, Q., Lee, B.Y., Clemens, D.L., et al. „Recombinant attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine expressing *Francisella tularensis* Ig1C induces protection in mice against aerosolized Type A *F. tularensis*.“ *Vaccine*, 2009: 27(8): 1216-29.

Jiang, X., Wang, X. „Cytochrome C-mediated apoptosis.“ *Annual Review of Biochemistry*, 2004: 73: 87-106.

Johansson, A., Berglund, L., Gothefors, L. „Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children.“ *Clinical Infectious Diseases*, 2000: 19(5): 449-53.

Krocova, Z., Härtlova, A., Souckova, D., et al. „Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*.“ *Microbial Pathogenesis*, 2008: 45(2): 79-85.

Lai, X.H., Golovliov, I., Sjöstedt, A. „Expression of *IglC* is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*.“ *Microbial Pathogenesis*, 2004: 37(5): 225-30.

Lai, X.H., Sjöstedt, A. „Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages.“ *Infection and Immunity*, 2003: 71(8): 4642-6.

Lawen, A. „Apoptosis-an introduction.“ *BioEssays*, 2003: 25(9): 888-96.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Dixit, V.M., Monack, D.M. „Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis.“ *Journal of Experimental Medicine*, 2005: 202(8): 1043-9.

Matsumoto, A., Kinoshita, M., Ono S., et al. „Cooperative IFN-gamma production of mouse liver B cells and natural killer cells stimulated with lipopolysaccharide.“ *Journal of Hepatology*, 2006: 45(2): 290-8.

McCaffrey, R.L., Allen, L.A. „*Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 2006: 80(6): 1224-30.

McLendon, M.K., Apicella, M.A., Allen, L.A. „*Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare.“ *Annual Review of Microbiology*, 2006: 60: 167-85.

Menon, A., Shroyer, M.L., Wampler, J.L., et al. „In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells.“ *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2003: 26(3): 157-74.

Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., et al. „Interleukin-10.“ *Annual Review of Immunology*, 1993: 11:165-90.

Nathan, C., Shiloh, M.U. „Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000: 97(16): 8841-8.

Oyston, P.C., Sjöstedt, A., Titball, R.W. „Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*.“ *Nature Reviews Microbiology*, 2004: 2(12):967-78.

Penn, R.L., Kinasewitz, G.T. „Factors associated with a poor outcome in tularemia.“ *Archives of Internal Medicine*, 1987: 147(2): 265-268.

Polsinelli, T., Meltzer, M.S., Fortier, A.H. „Nitric oxide-independent killing of *Francisella tularensis* by IFN-gamma-stimulated murine alveolar macrophages.“ *The Journal of Immunology*, 1994: 153(3): 1238-45.

Santic, M., Al-Khodor, S., Abu Kwaik, Y. „Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*.“ *Cellular Microbiology*, 2010: 12(2): 129-39.

Savitt, A.G., Mena-Taboada, P., Monsalve, G., Benach, J.L. „*Francisella tularensis* infection-derived monoclonal antibodies provide detection, protection, and therapy.“ *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009: 16(3): 414-22.

Schaad, U.B., Abdus Salam, M., Aujard, Y., et al. „Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an International Society of Chemotherapy commission.“ *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1995: 14(1): 1-9.

Schaible, U.E., Collins, H.L., Kaufmann, S.H. „Confrontation between intracellular bacteria and the immune system.“ *Advances in Immunology*, 1999: 71: 267-377.

Schulert, G.S., Allen, L.A. „Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 2006: 80(3): 563-71.

Sjöstedt, A. „Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen.“ *Microbes and Infection*, 2006: 8(2): 561-7.

Sjöstedt, A. „Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*.“ *Current Opinion in Microbiology*, 2003a: 6(1): 66-71.

Stenmark, S., Lindgren, H., Tärnvik, A., Sjöstedt, A. „Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*.“ *Microbial Pathogenesis*, 2003: 35(2): 73-80.

Stenmark, S., Sjöstedt, A. „Transfer of specific antibodies results in increased expression of TNF-alpha and IL12 and recruitment of neutrophils to the site of a cutaneous *Francisella tularensis* infection.“ *Journal of Medical Microbiology*, 2004: 53(Pt 6): 501-4.

Sun, P., Austin, B.P., Schubot, F.D., Waugh D.S. „New protein fold revealed by a 1.65 Å resolution crystal structure of *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC.“ *Protein Science*, 2007: 16(11): 2560-3.

Tärnvik, A., Berglund, L. „Tularaemia.“ *European Respiratory Journal*, 2003: 21(2): 361-73.

Tärnvik, A., Chu, M.C. „New approaches to diagnosis and therapy of tularemia.“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007: 1105: 378-404.

Telepnev, M., Golovliov, I., Grundström, T., et al. „*Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages.“ *Cellular Microbiology*, 2003: 5(1): 41-51.

Telepnev, M., Golovliov, I., Sjöstedt, A. „*Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells.“ *Microbial Pathogenesis*, 2005: 38(5-6): 239-47.

Vinogradov, E., Perry, M.B., Conlan, J.W. „Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide.“ *European Journal of Biochemistry*, 2002: 269(24): 6112-8.

Weiss, D.S., Henry, T., Monack, D.M. „*Francisella tularensis*: activation of the inflammasome.“ *Annals of the New York Academy of Science*, 2007: 1105: 219-237.

Yazawa, N., Fujimoto, M., Sato, S., et al. „CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes.“ *Blood*, 2003: 102(4): 1374-80.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. „The machinery of programmed cell death.“ *Pharmacology and Therapeutics*, 2001: 92(1): 57-70.

Zivna, L., Krocova, Z., Härtlova, A., et al. „Activation of B cell apoptotic pathways in the course of *Francisella tularensis* infection.“ *Microbial Pathogenesis*, 2010: 49(5): 226-36.

Zogaj, X., Chakraborty, S., Liu, J., et al. „Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus.“ *Microbiology*, 2008: 154(Pt 7): 2139-50.

pracovní postupy přejaty z Diplomové práce Bc. Lenka Kasmanová, 2009, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Webové zdroje informací:

<http://www.textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>, datováno k 23.4.2011

<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/mRNA.htm>, datováno k 23.4.2011

<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/tularemia/biofacts/tularemiafactshe%20%20et.html>, datováno k 23.4.2011

<http://biologie.upol.cz/metody/>, datováno k 23.4.2011

http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/RNeasy_Mini_Handbook.pdf, datováno k 23.4.2011

<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>, datováno k 23.4.2011

Signální cesta vedoucí k apoptóze (Obr. 1)

http://www.google.com/imgres?imgurl=http://www.bioscience.org/2008/v13/af/3070/fig2.jpg&imgrefurl=http://www.bioscience.org/2008/v13/af/3070/fulltext.asp%3Fbframe%3Dfigures.htm%26doi%3Dyes&usq=__pf7ffxt_UCwcRap140ltojk8d7A=&h=547&w=860&sz=241&hl=cs&start=20&zoom=1&tbnid=nr7XwkNEI7sogM:&tbnh=109&tbnw=171&ei=pending&prev=/search%3Fq%3Ddeath%2Breceptor%2Bpathway%26hl%3Dcs%26biw%3D1280%26bih%3D577%26gbv%3D2%26tbnid%3D171&itbs=1&iact=rc&dur=395&page=2&ndsp=20&ved=1t:429,r:1,s:20&tx=103&ty=52&biw=1280&bih=577, datováno k 23.4.2011