Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie

Bc. Kristýna Kárová

Studium populací lymfocytů v tenkém střevu prasete
Investigation of lymphocyte populations in the porcine small intestine

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Marek Šinkora, PhD.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27.8. 2012

Podpis

Tato práce byla umožněna díky finanční podpoře z grantových projektů Grantové agentury České republiky P502/10/0038 a P502/12/0110 a grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ME 09089. Část výsledků této práce byla použita v článku: Sinkora M., Stepanova K., Butler J., E., Francis D., Santiago-Mateo K., Potockova H., Karova K., Sinkorova J., 2011. Ileal Peyer´s Patches Are Not Necessary for Systemic B Cell Development and Maintenance and Do Not contribute Significantly to the Overall B Cell Pool in Swine. *The Journal of Immunology*. 187(10): 5150-5161.

Ráda bych hluboce poděkovala svému školiteli RNDr. Marku Šinkorovi, PhD. a celému kolektivu laboratoře MBÚ AV ČR, v. v. i. sektor imunologie a gnotobiologie v Novém Hrádku za pomoc, vedení a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Štěpánové a laborantkám Martě Stojkové, Lucii Poulové, Mirce Lantové a Šárce Pfeiferové za velkou pomoc při práci a zpracování výsledků a za psychickou podporu při dokončování této práce. Zároveň chci poděkovat svým rodičům, kteří byli nesmírně tolerantní a trpěliví a svou velkou podporou přispěli k dokončení této práce.

OBSAH

1. ABSTRAKT 7
ABSTRACT 8
2. SEZNAM ZKRATEK 9
3. ÚVOD 11
3.1 IMUNITNÍ SYSTÉM PRASETE A JEHO VÝZNAM 11
3.2 VROZENÁ IMUNITA 12
3.3 ADAPTIVNÍ IMUNITA 12
3.4 B LYMFOCYTY 13
3.5 T LYMFOCYTY 14
3.5.1 αβ T lymfocyty 14
3.5.2 γδ T lymfocyty 15
3.6 PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ LYMFATICKÉ ORGÁNY 16
3.6.1 GALT 17
3.7 VÝVOJ PRIMÁRNÍHO REPERTOÁRU PROTILÁTEK V PRIMÁRNÍCH LYMFATICKÝCH ORGÁNECH 18
3.7.1 V(D)J přeskupení 18
3.7.2 Genová konverze 21
3.7.3 Negativní selekce 22
3.7.4 Náhodné mutace 23
3.8 VÝVOJ SEKUNDÁRNÍHO REPERTOÁRU PROTILÁTEK V SEKUNDÁRNÍCH LYMFATICKÝCH ORGÁNECH 23
3.8.1 Somatické hypermutace 23
3.8.2 Revize BCR 24
3.8.3 Izotypový přesmyk 24
3.9 ONTOGENEZE HEMATOPOEZY A MÍSTA VÝVOJE LYMFOCYTŮ U PRASAT 25
3.10 ROZDĚLENÍ ŽIVOČICHŮ DLE MÍSTA VÝVOJE PRIMÁRNÍHO PROTILÁTKOVÉHO REPERTOÁRU 26
3.11 ZDŮVODNĚNÍ ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE 27
4. CÍLE PRÁCE 29
4.1 ZDŮVODNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE 29
5 MATERIÁL A METODY 31
5.1 ZVÍŘATA A ODBĚR VZORKŮ 31

5.1.1 Experimentální zvířata a chirurgické procedury 31
5.1.2 Experimentální design 31
5.2 PŘÍPRAVA LYMFOCYTŮ 32
5.2.1 Izolace směsi lymfocytů z tenkého střeva prasete 32
5.2.2 Izolace intraepiteliálních lymfocytů (IEL) a lymfocytů z *lamina propria* (LPC) 33
5.2.3 Izolace buněk z *lamina propria* 33
5.2.4 Izolace lymfocytů z Payerských plátů 33
5.2.5 Počítání buněk 33
5.3 FENOTYPIZACE BUNĚK 34
5.3.1 Značení buněk pro průtokovou cytometrii 34
5.3.2 Průtoková cytometrie 34
5.3.3 Sortování buněk 35
5.4 PRÁCE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI 35
5.4.1 Izolace RNA 35
5.4.2 Izolace DNA 35
5.4.3 Příprava cDNA 36
5.4.4 Polymerázová řetezcová reakce (PCR) 36
5.4.5 Agarózová elektroforéza 37
5.5 STATISTIKA 37
5.6 ROZTOKY, ČINIDLA, MÉDIA 38
5.6.1 Nejčastěji používané roztoky a pufry 38
5.6.2 Seznam použitých protilátek 39
5.6.3 Seznam použitých pomůcek a přístrojů 40
6. VÝSLEDKY 42
6.1 DISTRIBUCE POPULACÍ LYMFOCYTŮ NAPŘÍČ TENKÝM STŘEVEM SELETE 42
6.1.1 Distribuce αβ T lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty 42
6.1.2 Distribuce γδ T lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty 42
6.1.3 Distribuce B lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty 42
6.1.4 Distribuce NK buněk skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty 43
6.2 DISTRIBUCE SUBPOPULACÍ ZÁKLADNÍCH TYPŮ LYMFOCYTŮ V TENKÉM STŘEVU SELETE 45

6.2.1 Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat 45
6.2.2 Distribuce subpopulací γδT lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat 47
6.2.3 Distribuce subpopulací B lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat. 49
6.3 POROVNÁNÍ DISTRIBUCE RŮZNÝCH POPULACÍ LYMFOCYTŮ V EPITELU A *LAMINA PROPRIA* STŘEVA 52
6.3.1 Závislost přítomnosti lymfocytů a jejich subpopulací na přítomnosti Payerského plátu 52
6.3.2 Distribuce αβ T lymfocytů 52
6.3.3 Distribuce γδ T lymfocytů 53
6.3.4 Distribuce B lymfocytů 53
6.3.5 Distribuce NK buněk 53
6.4 POROVNÁNÍ DISTRIBUCE SUBPOPULACÍ ZÁKLADNÍCH TYPŮ LYMFOCYTŮ V EPITELU A *LAMINA PROPRIA* 55
6.4.1 Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů v rámci IEL a LPC 55
6.4.2 Distribuce subpopulací γδ T lymfocytů v epitelu a *lamina propria* 56
6.4.3 Distribuce subpopulací B lymfocytů v epitelu a *lamina propria* 57
6.5 Analýza stavu genového přeskupení sortovaných B lymfocytů 60
6.5.1 Exprese IgM a IgA u B lymfocytů izolovaných z *lamina propria*, Payerských plátů a epitelu 62
6.5.2 Stav genomového přeskupení a přepisovaných transkriptů pro jednotlivé imunoglobulinové třídy u sortovaných B buněk 62
7 DISKUZE 63
8 ZÁVĚR 67
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 68
10 PŘÍLOHY 76

1. ABSTRAKT

Prase je historicky řazeno ke skupině živočichů, které využívají určité části tenkého střeva k tvorbě plně rozvinutého primárního B buněčného repertoáru. Tvorba takového primárního B buněčného repertoáru je nezávislá na výskytu antigenu a připomíná primární lymfopoetickou aktivitu ptačí Fabriciovy bursy. Některé nálezy však toto zařazení prasat zpochybňují. Tato diplomová práce se zaměřuje na studium lymfocytů a jejich subpopulací v tenkém střevu mladých bezmikrobních a konvenčních selat s cílem zjistit, zda zastoupení lymfocytů je nebo není závislé na kolonizaci střeva. Pomocí průtokové cytometrie bylo též zjišťováno, zda existuje výrazný rozdíl mezi jednotlivými oblastmi tenkého střeva který by naznačoval, že prasata používají určité oblasti střeva pro vývoj B buněčného repertoáru. Současně byl pomocí analýzy nukleových kyselin zjišťován stav izotypového přesmyku u B lymfocytů izolovaných z různých částí tenkého střeva. Výsledky souhrně naznačují, že kolonizace střeva má zásadní vliv na vývoj všech základních populací lymfocytů i některých jejich subpopulací. Největší vliv kolonizace byl pozorován u B lymfocytů a jejich subpopulací. Na druhou stranu nebylo prokázáno, že distribuce lymfocytů v určitých oblastech tenkého střeva se zcela zásadně liší od jiných oblastí tenkého střeva. I když za místo určitých změn lze považovat oblast terminálního ilea, jsou tyto změny způsobeny nejspíše díky největší pravděpodobnost styku lymfocytů s bakteriálním obsahem tlustého střeva. Výsledky také naznačují, že v *lamina propria* se vyskytují spíše αβ T lymfocyty zatímco v epitelu je větší zastoupení γδ T lymfocytů. V souladu s obecnými nálezy se B lymfocyty v těchto kompenentách GALT objevují až po kolonizaci. Analýza genomu a transkriptů B buněk pro jednotlivé imunoglobulinové třídy naznačila, že zatímco v Payerských plátech dochází ke změně izotypu protilátek na úrovni alternativního sestřihu, v *lamina propria* se tomu děje na úrovni sekundárního přeskupení. Spekulujeme, že B lymfocyty začínají změnu izotypu v Payerských plátech alternativním sestřihem a vycestovávají do *lamina propria*, kde se usazují jako $IgA^{+}IgM^{-}$ B lymfocyty a dokončují změnu izotypu na úrovni DNA.

Klíčová slova

Prase, intraepiteliální lymfocyty, lymfocyty *lamina propria*, Payerské pláty, distribuce lymfocytů, izotypový přesmyk

ABSTRACT

Historically pig is allocated to a group of animals which use certain parts of their small intestine to acquire a fully developed primary B cell reperoire. Development of such primary repertoire is independent on the antigen presence and resembles the primary lymphopoietic activity of avian bursa of Fabricius. However, some findings concernig the pig´s alignment in the above mentioned group suggest otherwise. This graduation thesis is focused on the investigtion of lymphocyte populations and subpopulations in the small intestine of germ-free and conventional piglets. The aim is to determine whether the percentage amounts of lymphocyte populations is dependent on the intestinal colonization. Using Flow Cytometry the significant differences between individual samples were assesed allowing us to conclude which parts of the small intestine could possibly be used for the development of B cell repertoire. Moreover, the status of isotype switching of B lymphocytes isolated from different intestinal parts was determined by the means of PCR analysis. Our data suggest that the small intestine colonization has a crucial role in development of all the main lymphocyte populations as well as some of their subpopulations. The greatest influence of colonization was observed concerning B lymphocytes and their subpopulations. Oppositely, significant differences of lymphocyte distribution of individual parts of the small intestine were not discovered. Though we can say that noticeable deviations occur in the region of terminal ileum. These deviations are likely to be caused by the highly probable interaction of lymphocytes and bacteria of the large intestine. Our data also impose the predominance of αβ T lymphocytes in *lamina propria* and, in contrary, the predominance of γδ T lymphocytes in the intestinal epithelium. In agreement with general findings B lymphocytes in both *lamina propria* and epithelium occur after colonization. Analysis of B cell genome and transcripts regarding the Ig isotypes suggests that while there is a change of Ig isotype in Peyer´s patches by the means of alternative splicing, the class-switch in *lamina propria* occurs as secondary genome rearrangement. We speculate that B lymphocytes begin the class-switch process in Peyer´s patches using alternative splicing and then migrate to *lamina propria* where they settle as $IgA^{+}IgM^{-}$ B cells and finish the DNA rearrangement.

Keywords

Pig, intraepithelial lymphocytes, *lamina propria* lymphocytes, Peyer´s patches, distribution of lymphocytes, class-switch

2. SEZNAM ZKRATEK

AFC – antibody forming cell, protilátky produkující buňka

AID - activation-induced cytidine deaminase

BCR – B cell receptor, B buněčný receptor

BM – bone marrow, kostní dřeň

C geny – konstantní geny

CD – cluster of differentiation, CD znak

cDNA – komplementární DNA

CDR – complementarity determining region

CV- konvenční selata

DG – den gestace

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FACS – fluorescence – activated cell sorting, průtoková cytometrie

FAE – s folikuly asociovaný epitel

FR – framework segmenty

GALT – gut – associated lymphoid tissue, lymfoidní tkáň asociovaná se sliznicí tavicího traktu

GF- bezmikrobní selata

HSC – hematopoietic stem cell

IEL - intraepiteliální lymfocyty

IFNγ – interferon γ

IgA – imunoglobulin třídy A

IgD – imunoglobulin třídy D

IgM – imunoglobulin třídy M

ILF – izolované lymfatické folikuly

iNOS - inducibilní syntáza oxidu dusnatého

IPP – ileální PP

JPP – jejunální PP

LPC – buňky izolované z *lamina propria*

MALT – mucosa – associated lymphoid tissue, lymfoidní tkáň asociovaná se sliznicí

MHC I – major histocompatibility complex I

MHC II - major histocompatibility complex II

MLN – mezenteriální lymfatické nody

NK – natural killer, přirozený zabiječ

NO – oxid dusnatý

PBL – peripheral blood lymphocytes, lymfocyty periferní krve

PCR – polymerázová řetězová reakce

PP – Payerský plát

RNA – ribonukleová kyselina

SLC – surrogate light chain, prozatimní lehký řetězec

T_C – cytotoxic T lymphocyte, cytotoxický T lymfocyt

TCR – T cell receptor, T buněčný receptor

TdT – terminální deoxynukleotidyl transferáza

T_H – helper T lymphocyte, pomahačský T lymfocyt

μHC – μ heavy chain, těžký řetězec imunoglobulinu

3. ÚVOD

3.1 IMUNITNÍ SYSTÉM PRASETE A JEHO VÝZNAM

Imunitní systém prasat má v zásadě stejné komponenty jako ostatní savci (Šinkora a spol., 2010). Studium prasečího imunitního systému je významné zejména pro veterinární, vývojovou a srovnávací imunologii. Významné je využití studií na prasatech ve vetrinární medicíně pro vývoj nových vakcín (Gerner a spol., 2009). Prase je také využíváno jako modelový organismus pro lidské nemoci, převážně v případech, kdy je myší model nedostatečný nebo zcela nevhodný (Rogers a spol., 2008). Dále je prase hojně používáno v xenotransplantačních studiích (Ekser a spol., 2009) a pro přípravu humanizovaných protilátek (Butler a spol., 2012).

Význam prasete pro studium imunitního systému se ještě zvýšil při zjištění, že prasata, stejně jako například velryby či koně, disponují epiteliochoriálním typem placentace (Šterzl a Silverstein, 1967; Šinkora a Butler, 2009). To znamená, že placenta je připojena k mateřské tkáni volně. Choriové klky volně interagují s mikroklky mateřského epitelu. Tvoří se areolae, oblasti úplné separace placenty od matky. V časných stádiích je plod oddělen od prokrvení matky až šesti vrstvami, které pochází jak od matky, tak od plodu. Časem některé z kapilár plodu prorostou do trofoblastu, avšak i přesto mateřské protilátky a velké organické molekuly v plodu nelze detekovat. Z tohoto důvodu se selata rodí s naivním imunitním systémem. Pro přežití novorozeného selete je nezbytné napít se matčina mléka (kolostra), které obsahuje kromě nutričních složek i protilátky a lymfocyty matky. Mateřské protilátky jsou poté pohlceny střevním epitelem novorozence (Pabst a Rothkötter, 1999). Kolostrum proto nahrazuje placentární přenos protilátek mezi matkou a potomkem známý u jiných druhů placentace. V experimentálních podmínkách lze provést porod artificiálně do sterilních izolátorů pomocí hysterektomie, čímž jsou získána tzv. bezmikrobní selata (GF) (Butler a spol., 2012). Takováto selata jsou výjimečným modelem pro studium naivního imunitního systému, jeho vývoje a přímého vlivu antigenů a mikrobiálních organismů (včetně patogenů) bez vlivu mateřských a externích faktorů. Využití prasat v takových typech experimentů je podmíněn skutečnostmi, že prasata se rodí dostatečně vyspělá pro odchov bez matky a jako jediný druh s epiteliochoriálním typem placentace mají početné potomstvo.

Následné kapitoly se zabývají přehledem poznatků o imunitním systému prasat a jiných živočišných druhů, které jsou relevantní k této diplomové práci.

3.2 VROZENÁ IMUNITA

Vrozená (neboli nespecifická) imunita zajišťuje první linii obrany, protože její komponenty rozpoznávají v přírodě již přítomné a známé motivy. Charakteristikou nespecifické imunity je proto rychlá reakce, která zajišťuje bezprostřední ochranu organismu a většinou tato reakce časově předchází nástup adaptivní (specifické) imunity. Nevýhodou nespecifické imunity je skutečnost, že rozpoznávané motivy jsou obecné a neměnné a tedy pokud patogen změní své molekuly či životní strategii, může se účinkům nespecifické imunity vyhnout. Tato diplomová práce se zabývá analýzou nespecifické imunity pouze v případě NK buněk. U prasat byly NK buňky identifikovány jako $CD3^{-}$ $CD8^{+}$ (Pescovitz, a spol., 1988, Saalmüler a spol., 1994, Denyer a spol. 2006, Gerner a spol., 2009). NK buňky používají nespecifické NK receptory k přímému zabíjení viry infikovaných buněk a odpovídají na různé regulační cytokiny produkcí IFNγ a upregulací efektorových molekul perforinu a CD25 (Gerner a spol., 2009) . Zajímavostí NK buněk u prasat je nález, že ačkoliv tyto buňky jsou v embryu přítomny od 45. dne gestace (DG) a od DG70 až po narození se jejich relativní zastoupení pohybuje kolem 5-15% všech lymfocytů (Šinkora a Butler, 2009), před narozením nebylo pozorováno zabíjení NK buňkami a u bezmikrobních selat je tato aktivita opožděná (Huh a spol., 1981, Yang, 1986). To naznačuje, že je možná nutná maturace NK buněk závislosti na kolonizaci střeva. Množství NK buněk v PBL se pohybuje od 2-10% a s věkem se jejich počet snižuje (Gerner a spol., 2009).

3.3 ADAPTIVNÍ IMUNITA

Adaptivní (neboli získaná či specifická) imunita je založená na rozpoznávání všech molekul, které nejsou tělu vlastní (Jenaway a spol. 2001). V tomto případě, na rozdíl od vrozené imunity, dochází k rozpoznání i molekul, které v přírodě ještě neexistují nebo se formují v přírodě jako zcela nové. Takový přístup zajišťuje, že bude rozpoznán i patogen, který své struktury mění. Rychlost a efektivnost specifické imunity je závislá na tom, po kolikáté se imunitní systém s konkrétním antigenem setkává a pokud jde o antigen zcela nový, je specifická imunita závislá na imunitě nespecifické, která poskytne svou ochranou dostatečný čas pro nástup imunity specifické. Princip specifické imunity je zajišťován specifickými buňkami, tzv. lymfocyty, které se během svého vývoje v organismu naučí

rozpoznávat organismu vlastní antigeny, a proto reagují proti cizím antigenům. Lymfocyty se vyskytují u všech čelistnatců a dělí se podle své funkce, místa vývoje a typu specifického receptoru, který nesou na svém povrchu, na B a T lymfocyty. Společné pro všechny lymfocyty je tvorba jejich specifického receptoru, který vzniká principiálně stejným způsobem za pomocí V(D)J rekombinace (viz. dále). Stejný je i princip rozpoznávání antigenu, který se váže na silně variabilní oblasti na N-koncích receptoru, tzv. vazebné místo pro antigen. Ačkoliv je princip tvorby a rozpoznávací funkce specifického receptoru lymfocytů stejné, funkce a struktura jednotlivých typů lymfocytů je zcela odlišná.

3.4 B LYMFOCYTY

B lymfocyty nesou na svém povrchu B buněčný receptor (BCR), který rozpoznává antigeny přímo, a tento B buněčný receptor může být vylučován z B buněk do organismu jako imunoglobulin neboli protilátka. Rozdíl mezi membránovou a sekreční formou imunoglobulinu je pouze transmembránová oblast 20-ti hydrofóbních aminokyselin na C-konci polypeptidického řetězce, kterou jsou zakotveny v membráně. Jednotlivé verze BCR vznikají alternativním sestřihem na úrovni RNA (Jenawy a spol. 2001). BCR se skládá ze dvou identických těžkých a dvou identických lehkých řetězců. Každá molekula imunoglobulinu má tak dvě vazebná místa pro antigen. Název B lymfocyt je odvozen od označení Fabriciova bursa, což je specifická tkáň ptáků na dorsální části zadního střeva, kde probíhá vývoj většiny B lymfocytů (Glick, 1956). U intenzivně studovaných savců (jako je člověk či myš) se však B lymfocycty vyvíjejí v kostní dřeni (Nunez a kol. 1996). Problematikou vývoje B buněk se tato práce zabývá podrobněji dále.

U prasat neexistuje žádný pan-specifický B buněčný znak. Pro studium nativních prasečích B lymfocytů se proto využívá detekce těžkého řetězce pro IgM, tzv. μHC. Ačkoliv tento přístup znemožňuje detekci konečných stádií vývoje B buněk jako jsou plasmatické buňky, zvolený přístup je přijatelný, protože naprostá většina vývojových stádií B buněk nese na svém povrchu BCR typu IgM a izotypově přesmyknuté buňky lze detekovat pomocí exprese dalších imunoglobulinových tříd. Pomocí tohoto přístupu bylo zjištěno, že jednotlivá stádia vyzrávání prasečích B buněk lze v periferii sledovat pomocí exprese molekul CD21 a CD2 (Šinkora a Butler, 2009). Většina naivních B lymfocytů má fenotyp $CD2^{+}CD21^{+}$ a všechny B buňky ve fetálním období vývoje mají tento fenotyp. Populace $CD2^{-}CD21^{+}$ B buněk se objevuje až po narození a úspěšné kolonizaci trávicího

traktu. Molekula CD2 u B buněk pravděpodobně funguje stejně jako u T buněk a má tedy adhezivní funkci (Šinkora a spol., 1998a). Ke ztrátě molekuly CD2 dochází výsledkem mezibuněčného kontaktu s její receptorovou molekulou CD58 na povrchu antigen prezentujících buněk. Sortovací experimenty za použití čistých subpopulací B buněk prokázaly, že $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocyty téměř okamžitě (v řádu minut až několika hodin) získávají zpět molekuly CD2 na svém povrchu a vracejí se zpět do populace $CD2^{+}CD21^{+}$ B buněk (Šinkora a Butler, 2009). To naznačuje, že $CD2^{-}CD21^{+}$ populace tvoří B lymfocyty, které kontaktovaly pomocné buněčné typy s cílem se aktivovat. V případě úspěšné aktivace B lymfocyty vyzrávají a ztrácí molekuly CD21. Vzniklé efektorové $CD2^{+}CD21^{-}$ B lymfocyty se značně dělí a zvyšují svůj počet. Při dalším vyzrávání a vzniku plazmatických buněk dochází ke ztrátě povrchové exprese IgM a případně i CD2. V $CD2^{-}CD21^{-}$ stádiu se B buňky dostávají do klidové fáze a již pouze vylučují protilátky, většinou jako plazmatické buňky (Šinkora a Butler, 2009).

3.5 T LYMFOCYTY

T lymfocyty vznikají v brzlíku z prekurzorů, které pocházejí z hematopoetických center jako je kostní dřeň a do brzlíku migrují (Jenaway a spol. 2001). Od brzlíku je odvozen název T buněk (lat. thymus). T lymfocyty se dělí podle typu T buněčného receptoru (TCR), který zajišťuje specifickou imunitu na αβ a γδ (Jenaway a spol. 2001). I když oba typy TCR se, na rozdíl od BCR, skládají z jednoho těžkého a jednoho lehkého řetězce (mají tedy pouze jedno vazebné místo pro antigen), funkčně jsou αβ a γδ T lymfocyty zcela odlišné.

3.5.1 αβ T lymfocyty

T lymfocyty typu αβ nesou na svém povrchu αβ TCR, který rozpoznává pouze fragmenty antigenů prezentovaných na molekulách histokompatibilních antigenů (MHC). Obecně lze αβ T lymfocyty rozdělit na $CD4^{-}CD8\alpha\beta^{+}$ cytotoxické (Tc z angl. cytotoxic) a $CD4^{+}CD8\alpha\beta^{-}$ pomocné (T_H z angl. helper). Pomocné T_H lymfocyty lze rozdělit do několika podskupin z nichž u prasat byly identifikovány regulační αβ T lymfocyty (T_{reg} z angl. regulatory), které mají obdobný fenotyp jako u lidí nebo myší a to $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ (Gerner a spol, 2009) . T lymfocyty typu αβ mají stejný základní receptor TCR, ale funkčně jsou odlišné. Zatímco Tc lymfocyty ničí infikované a nádorové buňky a rozpoznávají rozštěpené antigeny na MHC-I molekulách pomocí pomocných molekul CD8, T_H lymfocyty modifikují imunitní odpověď a aktivují další buňky

imunitního systému rozpoznáním rozštěpených antigenů na MHC-II molekulách pomocí pomocné molekuly CD4 (Jenaway a spol., 2001). Zvláštností u prasat je skutečnost, že po aktivaci se T_H lymfocyty u prasat nejsou schopny zbavit pomocných aktivačních molekul MHC-II a CD8α (Summerfield a spol., 1996, Šinkora a Butler, 2009). Výsledkem je přítomnost tzv. dvojitě pozitivních (double-positive) $CD4^+CD8\alpha^+$ αβ T lymfocytů v periferii, které reprezentují efektorová a paměťová stádia T_H lymfocytů (Saalmüller a spol., 1989, Summerfield a spol., 1996, Šinkora a Butler, 2009). Tyto efektorová/paměťová stádia prakticky chybí u novorozených selat (Pescovitz a spol., 1994, Zuckermann a spol. 1999).

3.5.2 γδ T lymfocyty

T lymfocyty typu γδ nesou na svém povrchu γδ TCR. Tyto lymfocyty jsou stále považovány za záhadnou skupinu lymfocytů, jejichž funkce není zcela známá (Scotet a spol., 2008). Bylo prokázáno, že subpopulace γδ T lymfocytů mají cytolytickou aktivitu. Lymfocyty typu γδ také dokáží prezentovat antigen a z toho důvodu mají na svém povrchu molekuly MHC II i CD80/86 (Gerner a spol, 2009). Myší a lidské γδ T lymfocyty mohou odpovídat na antigeny nepeptidové povahy (Hayday, 2000). Stimulace γδ T lymfocytů u prasete lze dosáhnout pomocí extraktu z rostliny *Acanthospermum hispidum*, nicméně konkrétní zodpovědná složka není známa. Dále byla popsána produkce IFNγ po styku s mykobakteriemi, kdy odpověď byla silnější po předchozí imunizaci prasete pomocí BCG (Bacillus Calmette Guerin), což naznačuje možnou tvorbu imunologické paměti γδ T lymfocytů (Summerfield et Saalmüller, 1998, Lee a spol., 2004). Cytotoxická aktivita byla popsána např. v práci Olina, který zkoumal odpověď γδ T lymfocytů na *Mycobacterium bovis* (Olin a spol., 2005). Z důvodu, že γδ T lymfocyty nepotřebují MHC molekuly ke své funkci se předpokládá, že γδ T lymfocyty rozpoznávají antigeny přímo, podobně jako B lymfocyty. Svůj T buněčný receptor ale γδ T lymfocyty nevylučují ven z buňky, jak je tomu u protilátek, a jejich funkce je většinou cytotoxická, podobně jako u cytotoxických αβ T lymfocytů. Rozdíl je v tom, že k rozpoznání antigenu pomocí γδ T lymfocytů nejsou zapotřebí žádné další buňky či kostimulační signály. Protože γδ T lymfocyty „vidí“ antigen přímo a nepotřebují pomocné buňky, jsou často řazeny do složky nespecifické imunity. Tvorbu svých receptorů ale provádějí stejně jako B lymfocyty a αβ T lymfocyty: tedy předvídavě pomocí V(D)J rekombinace (viz. dále) a nezávisle na existujícím souboru molekul v přírodě. Frekvence γδ T lymfocytů u lidí a myší v cirkulaci a lymfoidních

orgánech je velmi nízká (kolem 1-5% všech lymfocytů), nicméně existují zvířecí druhy, jako například prase, u kterých γδ T lymfocyty tvoří v některých periferních lymfatických orgánech až 80% všech lymfocytů (Šinkora a Butler, 2009). Prasečí γδ T lymfocyty lze rozdělit na základě dalších pomocných molekul, kterými jsou molekuly CD2 a CD8α. Tyto subpopulace jsou v organismu distribuovány tkáňově specificky: slezina a další sekundární lymfatické orgány obsahují zejména γδ T buňky s fenotypem $CD2^{+}CD8\alpha^{+}$ a $CD2^{+}CD8^{-}$. Oproti tomu v krvi se vyskytují především buňky, které na povrchu neexprimují ani CD2, ani CD8. Jsou tedy $CD2^{-}CD8^{-}$ (Yang a spol., 1996, Hayday, 2000, Gerner a spol., 2009, Šinkora a Butler, 2009). Bylo navrženo, že homogenní distribuce dominantních γδ T lymfocytů ve střevu prasete je výsledkem expanze γδ T lymfocytů vybraných ligandem ve střevu s jejich následnou distribucí napříč tímto orgánem (Butler a spol., 2006). I když je jisté, že se všechny tyto subpopulace vyvíjejí v brzlíku jako samostatné linie buněk (Šinkora a spol., 2005 a 2007), nejnovější práce naznačují, že mohou svůj fenotyp měnit v závislosti na jejich funkci (Štěpánová a spol., 2011).

3.6 PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ LYMFATICKÉ ORGÁNY

Lymfocyty vznikají z hematopoetických kmenových buněk (HSC, Hematopoetic Stem Cell) a jejich prvotní vývoj je dokončen vznikem zralého lymfocytu, který na svém povrchu nese specifický lymfoidní buněčný receptor (Jenaway a spol. 2001). Pro tuto primární fázi vývoje je charakteristický vznik BCR nebo TCR při kterém dochází k přeskupování genových segmentů a vzniku těžkého a lehkého řetězce. Tento proces probíhá v primárních lymfatických orgánech. Vývoj lymfocytů v primárních lymfatických orgánech je nezávislý na přítomnosti antigenu a výsledkem je vznik primárního receptorového repertoáru (Maul a Gearhard, 2010; Pabst a spol, 2007).

Druhá fáze vývoje lymfocytů probíhá v sekundárních lymfatických orgánech po navázání antigenu na specifický receptor lymfocytů. Tento vývoj je tedy závislý na antigenu a je jím řízen. Antigen, proti kterému je namířena imunitní reakce lymfocytů rozhoduje o tom, které lymfocyty budou proliferovat a případně jak budou měnit svůj specifický receptor. Antigen proto určuje konečnou podobu sekundárního receptorového repertoáru. Typickým příkladem jsou germinální centra sekundárních lymfatických orgánů, nicméně k sekundárnímu vyzrávání lymfocytů může docházet i kdekoliv v periferii (Berek a spol., 1991; Maul a Gearhard, 2010).

3.6.1 GALT

GALT (Gut-assotiated lymphoid tissue) patří do skupiny slizniční lymfoidní tkáně MALT (Mucosa-assotiated lymphoid tissue). Zhruba polovina všech lymfocytů imunitního systému je součástí MALT. GALT zahrnuje Payerské pláty (PP), mezenteriální lymfatické nody (MLN), intraepiteliální lymfocyty (IEL) a lymfocyty v *lamina propria* (LPC) (Kaleczyc, 2010). GALT je zodpovědný za obranu organismu a indukci orální tolerance (Mowat, 2003, Mechado, 2005). Kromě imunologických funkcí mají zřejmě lymfocyty v epitelu a v *lamina propria* funkce v udržování epiteliální integrity a mají tak i funkci bariéry (Schwarz a Saalmüller, 2005). Studium lymfocytů z *lamina propria* může být ovlivněno izolovanými lymfatickými folikuly (ILF) ve sliznici, které nelze pouhým okem vidět (Pabst a Rothkötter, 1999).

Oproti hlodavcům obsahuje prasečí tenké střevo lymfoidní buňky hned po narození (Pabst a Rothkötter, 1999). Bylo pozorováno, že u germ-free selat je menší množství lymfocytů v epitelu než u konvenčních selat. Velmi mladá selata jsou náchylná k infekci a důvodem je zřejmě malé množství IEL i LPC. IEL prasete proliferují *in situ*, což je v rozporu s pozorováním v případě lidských IEL (Pabst a Rothkötter, 1999, Vega – López a spol., 2001). Dle Vega – Lópeze mohou mít intraepiteliální lymfocyty původ v *lamina propria* a to díky svému homogennímu umístění po délce klku. Tyto lymfocyty zřejmě migrují epitelem, ale nikdy se nehromadí v apikální oblasti, zřejmě proto, že antigenní stimulace přichází z bazolaterální strany enterocytu. Intraepiteliální lymfocyty jsou zřejmě jedny z hlavních lymfocytů zodpovědných za indukci tolerance nebo anergie vůči neškodným potravním antigenům či komensálním bakteriím a naopak iniciují imunitní odpověď v případě nebezpečí (Vega – López a spol., 2001).

Lymfoidní tkáň se vyskytuje v různých vrstvách slizniční stěny ve formě shluků lymfoidních folikulů s interfolikulárními oblastmi (Mazzoni a spol., 2011, Croitoru et Bienenstock, 1994). GALT je rozdělen do induktivních a efektorových míst. Mezi induktivní místa se řadí Payerské pláty a ILF. Tato místa zajišťují sekreci IgA B lymfocyty a jsou zdrojem klonálních B lymfocytů. Efektorovou část představují epitel a *lamina propria* (Mazzoni a spol. 2011, Newberry, 2008, Fagarasan et Honjo, 2004). Prasečí PP jsou snadno pozorovatelnou součástí tenkého střeva, která byla identifikována již v 50. dni gestace a jsou pokryté folikuly asociovaným epitelem (FAE), který obsahuje M buňky důležité pro pohlcení antigenů z lumen střeva do GALT. Payerské pláty a ILF obsahují

germinální centra s oddělenými B a T buněčnými oblastmi (Pabst a Rothkötter, 1999, Mazzoni a spol. 2011, Newberry, 2008).

Prasata společně se skotem se vyznačují tím, že u nich existují kontinuální Payerské pláty v oblasti ilea, které obsahují z většiny B lymfocyty, jejichž množství převyšuje T lymfocyty (Rothkotter a Pabst, 1989, Leiebler-Tenorio a Pabst, 2006). Tyto ileální Payerské pláty (IPP) se věkem zmenšují. IPP tvoří kontinuální sestava Payerských plátů v kterých jsou folikuly podobné primárním folikulům lymfatických uzlin. U germ-free selat se zde vyskytují téměř výlučně IgM^+ B lymfocyty, zatímco u konvečních selat je 3x až 40x větší zastoupení IgA^+ a IgG^+ B lymfocytů. Druhým typem Payerských plátů jsou diskrétní (oddělené) Payerské pláty, které se vyskytují v jejunu a předním ileu (Butler a spol. 2002). Při studiu těchto jujenálních Payerských plátů (JPP) jich bylo napočteno okolo dvaceti, přičemž jejich umístění se s věkem nemění (Rothkotter a Pabst, 1989, Leiebler-Tenorio a Pabst, 2006).

3.7 VÝVOJ PRIMÁRNÍHO REPERTOÁRU PROTILÁTEK V PRIMÁRNÍCH LYMFATICKÝCH ORGÁNECH

Primární vývoj B lymfocytu zahrnuje tvorbu BCR pomocí V(D)J přeskupení a jeho případnou úpravu pomocí genové konverze, receptorové editace nebo náhodných mutací nezávislých na antigenu.

3.7.1 V(D)J přeskupení

Tvorba BCR v primárních lymfatických orgánech probíhá během vývoje B lymfocytů náhodným spojováním (tzv. přeskupením) mnohdy velmi početné skupiny genových segmentů na úrovni DNA (Jenaway a spol. 2001). Tyto genové segmenty jsou jako templát pro přepis do proteinové podoby před přeskupením nefunkční a jsou na základě jejich pozice po přeskupení rozdělovány do čtyř skupin: V geny (variable), D geny (diversity), J geny (joining) a C geny (constant). Výsledkem přeskupení je velké množství molekul s vlastní sekvencí aminokyselin, které poskytují svému nositeli obranyschopnost k mimořádně velkému počtu potenciálních antigenů. Unikátní pro tento systém je skutečnost, že tvorba vazebného místa receptorů je předvídavá a není omezována přítomností antigenu v okolním prostředí (B lymfocyty produkují specifické receptory proti potenciálním antigenům ještě před tím, než se s nimi setkají). Tento systém proto v konečném důsledku

umožňuje změnu genotypu jedince během jeho života a přežití druhu tak není závislé na generace trvajícím přírodním výběru díky spontánním mutacím zárodečných genů. Protože změny vazebného místa BCR probíhají na úrovni DNA, každá jednotlivá B buňka nese na svém povrchu BCR s pouze jednou vazebnou specificitou a je schopna produkovat protilátky různých typů a podtypů se stejnou vazebnou specificitou (Jenaway a a kol. 2001).

Přeskupení těžkých a lehkých řetězců při vývoji B buňky probíhá postupně. Prvním čistě B buněčným prekurzorem je proB buňka, která je předurčena se vyvíjet do B buněčné linie, nicméně má všechny V(D)J segmenty v zárodečné (germline) konfiguraci (Hardy et Hayakawa, 2001). U proB buněk nejprve probíhá přeskupení u těžkých (heavy) řetězců, kdy dochází ke spojení D_H a J_H segmentů na obou chromozomech za vzniku preB-I buňky. Tato preB-I buňka v následujícím kroku přidává na jednom z chromozomů jeden náhodně vybraný V_H subgen výsledkem čehož je kompletní VDJ_H přeskupení v preB-II buňkách (Alt a spol., 1984, Zou a spol., 2003). Důležitá je skutečnost, že během VDJ_H přeskupení může docházet díky přítomné enzymatické aktivitě (3‘->5’ a 5’->3’ exonukleázy a terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT)) k náhodnému zkracování a prodlužování V_H, D_H a J_H segmentů. Výsledkem je náhodná sekvence označovaná jako CDR3 (complementarity-determining region), která je zčásti nezávislá na genomu jedince a určuje náhodnou specificitu protilátky (Melchers a spol. 1993).

Ve stádiu preB-II buněk se přeskupený těžký řetězec přepisuje do primární RNA, která obsahuje sestřiženou oblast VDJ_H a všechny následné úseky C oblastí. Primární RNA je poté sestřižena do autentické RNA, ve které je VDJ_H oblast připojena k první C oblasti, která vždy kóduje IgM. Tato autentická RNA je poté přeložena do membránové formy proteinu těžkého řetězce pro IgM. PreB-II buňky s přeskupenými VDJ_H geny mohou následně diferencovat pouze v případě, že je jejich produkt přeskupení funkční. Díky náhodnému spojování, prodlužování a zkracování V_H, D_H a J_H segmentů musí být ve správném čtecím rámci, neobsahovat stop kodony pro ribozomy a musí být schopen se párovat s lehkým řetězcem a vytvořit tak funkční molekulu imunoglobulinu (Butler a spol. 1996, Reynaud a spol. 1989, McCormack a spol. 1991). Funkčnost (produktivita) těžkého řetězce se testuje pomocí pre-BCR receptoru, kdy se molekula právě přeskupeného a přeloženého těžkého řetězce imunoglobulinu spojuje s záchranným lehkým řetězcem (SLC, z angl. Surrogate Light Chain), který je v pre-B-II buňkách exprimován místo autentického lehkého řetězce, který ještě není sestřižen (Hardy et Hayakawa, 2001; Zou a

spol., 2003). SLC je složen ze dvou řetězců λ5 (homologní ke konstantní oblasti lehkého řetězce) a VpreB (homologní k variabilní oblasti lehkého řetězce), z nichž ani jeden nepodléhá přeskupení, a proto jsou neměnné ve své sekvenci i struktuře (Melchers a spol. 1993). Pokud je těžký řetězec produktivní, dokáže se párovat se SLC a následně se objeví na membráně pre-B-II buněk ve formě pre-BCR. Ukotvení těžkého řetězce v membráně zaručí, že preB-II buňka přežije, zastaví se přeskupování VDJ_H genů na druhém chromozomu (alelická exkluze) a preB-II buňka se může vyvíjet do dalšího stadia. V případě neúspěchu se VDJ_H rekombinace opakuje na druhém chromozomu. Pokud ani poté nedojde k vytvoření produktivního těžkého řetězce, pre-B-II buňka nenávratně umírá (Melchers, 1999). Ve skutečnosti méně než 50% všech prekurzorů B buněk je schopno přeskupit funkční geny pro těžké řetězce a pokračovat v dalším vývoji.

Buňky s úspěšně vytvořeným pre-BCR klonálně expandují a jednotlivě přeskupují V_L a J_L genové segmenty pro lehký (light) řetězec protilátky (Ehlich a spol. 1993, Ghia a spol. 1996; Hardy a spol., 2000). Přeskupování lehkých řetězců probíhá podobným způsobem, který byl popsán pro těžké řetězce. Výjimkou jsou skutečnosti, že (1) u lehkých řetězců dochází pouze k spojování V_L k J_L segmentu za vzniku VJ_L komplexu, (2) V_L a J_L geny jsou dvojího druhu (Vκ a Jκ nebo Vλ a Jλ) a jsou při sestřihu na sobě nezávislé, protože jsou umístěny na různých chromozomech a (3) uspořádání V_L a J_L segmentů lehkých řetězců na úrovni DNA a absence D segmentu umožňuje několikanásobné přeskupení, ve kterém lze chybný čtecí rámec a případné stop kodony poopravovat až do doby, kdy se podaří vytvořit funkční lehký řetězec. Vytvořit produktivní lehký řetězec se proto podaří téměř každé budoucí B buňce. V následném vývoji B buňky je SLC nahrazen autentickým lehkým řetězcem za vzniku nezralé B buňky, která má na svém povrchu funkční BCR a která je exportována z primárního lymfatického orgánu do periférie (Ehlich a spol. 1993, Ghia a spol. 1996).

Z výše uvedeného textu je zřejmé, že V(D)J přeskupení přispívá při formování primárního repertoáru protilátek mnohočetnými V-D-J segmenty u těžkých i lehkých řetězců, jejich náhodnou kombinací u těžkých i lehkých řetězců, libovolným zkrácením a přidání náhodných nukleotidů v CDR3 oblasti u těžkých i lehkých řetězců a také různou kombinací lehkých a těžkých řetězců.

3.7.2 Genová konverze

Specificita vazebného místa BCR ve vazebné oblasti je určována třemi krátkými úseky jak u lehkých, tak i těžkých řetězců. Tyto tři variabilní úseky jsou označovány jako CDR1 až CDR3 a jsou od sebe odděleny čtyřmi základními úseky, které jsou méně proměnlivé a jsou označovány FR1 až FR4 (Jenaway a spol. 2001). Molekula imunoglobulinu je v terciální struktuře poskládána tak, že CDR oblasti lehkých i těžkých řetězců tvoří vazebné místo a obepínají antigen (celkem tedy šest CDR3 oblastí). CDR1 a CDR2 oblasti jsou určovány V genovými segmenty, CDR3 oblast je určována oblastí přeskupení V(D)J segmentů. Díky svému prostorovému uspořádání jsou CDR3 oblasti pro specificitu protilátek zásadní, což také dokázaly funkční studie (Davis et Bjorkman, 1988, Tonegawa, 1983). Protože sekvence CDR3 oblasti je ve skutečnosti nezávislá na genomu jedince díky náhodnému prodlužování a zkracování V(D)J segmentů, mohou i živočišné druhy s omezeným počtem V(D)J genů vytvořit stejné spektrum protilátek jako živočišné druhy s vysokým počtem těchto segmentů. Takovým příkladem je například prase, které tvoří stejný repertoár protilátek jako člověk (který má desítky V_H a D_H segmentů a šest J_H segmentů), a přitom má ve svém genomu pouze jeden J_H, dva D_H a osm nejpoužívanějších V_H genů (tedy teoreticky pouze 16 druhů kombinací; Šinkora a spol., 2003).

I přes tyto mechanismy však některé zvířecí druhy vyvinuly ještě další způsob umožňující zvýšit proměnlivost primárního protilátkového repertoáru, tzv. genovou konverzi. Důvodem pro evoluci genové konverze je zřejmě skutečnost, že druhy, které jí používají, generují nezralé B buňky pomocí V(D)J rekombinace po velmi krátký čas (pouze v embryonálním životě), mají podobně jako prase velmi nízký počet V(D)J segmentů a nemají aktivní TdT enzym nutný k náhodnému přidávání nukleotidů do CDR3 oblasti. Primární repertoár protilátek vzniklý V(D)J rekombinací je proto velmi nízký. Typickým příkladem zvířecích druhů využívající genovou konverzi jsou ptáci (Michael et Ratcliffe, 2006). Genová konverze probíhá v nezralých B buňkách, které prodělali V(D)J rekombinaci, migrovali do specializovaných primárních lymfatických orgánů umístěných v zadním střevě (u ptáků Fabriciova bursa), proliferují a samo-obnovují se. V takových B buňkách dochází pomocí nereciproční homologní rekombinace k přenosu částí genových segmentů (10-300 párů bází) z nefunkčních V_H a V_L pseudogenů na funkčně přestavěné VDJ_H a VJ_L geny pro imunoglobuliny (Michael a Ratcliffe, 2006). Protože jde o homologní rekombinaci, mění se převážně úseky CDR1 a CDR2 oblastí, nicméně v rámci jedné CDR oblastí může dojít k několika záměnám z několika různých pseudogenů.

Potenciál změny sekvence V(D)J genů je proto extrémní a umožňuje vytvořit primární repertoár protilátek o stejném rozsahu jako v případě V(D)J přeskupení. Je záhodno podotknout, že genová konverze je specifický proces pozměňování funkčního BCR připomínající receptorový editing (viz. níže) používaný při negativní selekci nezralých B buněk kdy dochází k sekundárnímu přeskupení lehkých řetězců a změně vazebnosti imunoglobulinu i u zvířecích druhů, které genovou konverzi nepoužívají.

3.7.3 Negativní selekce

Nezralá B buňka, která právě vznikla v primárním lymfatickém orgánu, prodělala během svého vývoje pozitivní selekci (funkční BCR schopný vázat antigen zajistil přežití této B buňky). Pro správné fungování imunitního systému je však důležitý také mechanismus negativní selekce. Tento děj zajišťuje, že nezralé buňky schopné silně vázat antigen budou tento antigen snášet (tolerovat), zatímco zralé B buňky budou tvořit pouze repertoár antigen-specifických buněk, které nereagují s vlastními autoantigeny (Jenaway a spol. 2001). Tato fáze vývoje B lymfocytů probíhá při přechodu buněk z primárních lymfatických orgánů do periferie (sekundární lymfatické orgány, krev a nelymfoidní tkáně). Tolerance B buňky k antigenu je zajišťována třemi způsoby: (1) eliminace buněk (delece), (2) neodpovídavost (anergie) nebo (3) editace BCR (receptor editing). Při editaci BCR dochází k sekundárnímu přeskupení lehkých řetězců a změně vazebnosti imunoglobulinu (díky uspořádání V_L a J_L segmentů na úrovni DNA a možnosti několikanásobného přeskupení lehkých řetězců; Nemazee et Weigert, 2000). Typ odpovědi je závislý na typu antigenu, síle vazby BCR k antigenu, anatomickém místu výskytu B buňky a také na tom, v jakém stádiu vyzrávání se B lymfocyt právě nachází a jaké stimulační a pomocné signály obdrží ze svého okolí. Editace BCR proto umožňuje změnit primární receptor protilátek, upravit případnou autoreaktivitu B buněk a předejít jejich smrti. Čerstvě vzniklé B lymfocyty vycestované z primárních lymfatických center jsou nejvíce náchylné k negativní selekci, signalizace přes BCR bez dalších pomocných signálů vede k potlačení těchto buněk a ke snášenlivosti antigenu. Má se za to, že asi 60-70% všech funkčních B buněk vzniklých v primárních lymfatických centrech je silně autoreaktivních. Připočteme-li eliminaci nízko-autoreaktivních B buněk při cirkulaci skrze tělo jedince, sníží se původní soubor funkčních B buněk na pouhých přibližně 15% (Jenaway a spol. 2001). Stádia vývoje nezralých a naivních zralých B buněk jsou

přechodnými stádii mezi primárním a sekundárním receptorovým repertoárem a jsou označovány jako T (transitional) stádia.

3.7.4 Náhodné mutace

Během vývoje primárního protilátkového repertoáru může docházet i k náhodným mutacím nezávislých na přítomnosti antigenu. Tyto náhodné nukleotidové substituce jsou převážně lokalizovány do CDR oblastí. Náhodné mutace jsou podobné somatickým hypermutacím, které se používají při formování sekundárního protilátkového repertoáru (viz. níže).

3.8 VÝVOJ SEKUNDÁRNÍHO REPERTOÁRU PROTILÁTEK V SEKUNDÁRNÍCH LYMFATICKÝCH ORGÁNECH

B lymfocyty, jejichž BCR neváže auto-antigeny a které projdou T stádii nezralých B buněk přežívají a stávají se z nich naivní zralé B lymfocyty. Zralou B buňku lze aktivovat skrze BCR jen v případě, že dodané signály jsou podány ve správném pořadí, správným způsobem, ve správné intenzitě a na správném místě (Jenaway a spol. 2001). Tento proces je většinou kontrolován pomocnými T_H buňkami, které rozpoznávají svým TCR část stejného antigenu prezentovaného na MHC-II molekulách buď samotných B buněk nebo antigen prezentujících buněk. Funkčně se po stimulaci zralá B buňka mění v B buněčný blast a proliferuje. Většina B blastů se následně mění do efektorových, protilátky produkujících buněk (AFC, angl. antibody forming cells) a dále pak do plasmatických buněk, jejíchž hlavní činností je produkovat protilátky. Některé B blasty se mohou měnit v paměťové buňky (Azulay-Debby et Melamed, 2007, Edry et Melamed D. 2004, Šinkora 2003, Allman a spol., 2004). Úspěšná aktivace zralé B buňky a její následná proliferace probíhá v sekundárních lymfatických centrech a určuje výslednou podobu sekundárního imunoglobulinového spektra. Na tomto procesu se podílejí somatická hypermutace, revize BCR a izotypový přesmyk tříd.

3.8.1 Somatické hypermutace

Při somatické hypermutaci dochází k nukleotidovým substitucím a v menší míře také k delecím a inzercím v genových segmentech kódujících variabilní části lehkých a těžkých imunoglobulinových řetězců. Tyto mutace neprobíhají náhodně a jsou cílené (Durandy, 2003). Nejvíce hypermutací probíhá v CDR oblastech a jejich frekvence je velmi vysoká, až 10^{-3}. U myší a lidí je takto v Peyerových plátech změněno více jak 5%

sekvencí kódujících variabilní oblasti (Muramatsu a spol., 2000; Spencer a spol., 2009). Germinální centra mají následně možnost vyselektovat buňky se zvýšenou afinitou k antigenu. Oproti primárnímu repertoáru je afinita vzniklých protilátek větší o 4 – 6 řádů (Hořejší a Bartůňková, 2009).

3.8.2 Revize BCR

Při revizi BCR (receptor revision) dochází u zralých buněk ke změně vazebného místa protilátky sekundárním přeskupením podobně jako u nezralých B buněk v případě editace BCR (Nemazee et Weigert, 2000). Ačkoliv těžké řetězce se nemohou znovu přeskupovat z důvodu uspořádání v genomu a vystřižením všech D_H segmentů, u lehkých řetězců může docházet k vícenásobnému V_L-J_L přeskupení a tím změně sekundárního reprtoáru protilátek.

3.8.3 Izotypový přesmyk

Při izotypovém přesmyku tříd dochází ke změně typu těžkého řetězce a tedy i ke změně imunoglobulinové třídy. Přeskupené VDJ_H geny lze při sestřihu připojit k různým druhům konstantních (C_H) genů těžkého řetězce. Změna typu C_H genu se projeví změnou izotypu imunoglobulinu. V primárních lymfatických centrech při vývoji B buňky dochází vždy nejprve k tvorbě těžkého řetězce typu IgM (μHC), protože Cμ segment leží u všech známých zvířecích druhů nejblíže VDJ_H oblasti (Wang et Clarke, 2004, Durandy, 2003). To je také důvod toho, že (1) se u B buněk při jejich vývoji nejdříve objevuje povrchový IgM, (2) časná exprese IgM je průvodním znakem nezralých B buněk a (3) IgM je produkován do okolí buněk jako první protilátka před následnou změnou izotopu, ke kterému dochází v pozdějším vyzrávání B buňky. Ke změně exprese C genu těžkého řetězce dochází dvěma možnými způsoby. Buď může být primární RNA sestřižena alternativními sestřihy, nebo může být vzdálenější C gen těžkého řetězce rekombinován blíže k J_H oblasti podobným způsobem, jako je tomu u V(D)J přeskupení (Hardy a Hayakawa 2001). Prvně popsaný způsob je u AFC a plazmatických buněk méně častý a uplatňuje se především u naivních a časných efektorových B buněk, které mají BCR s dvojím typem C_H řetězce (například IgM^+IgD^+ B buňky nebo IgM^+IgA^+ B buňky). Druhá alternativa je u AFC a plazmatických buněk častější, je však nevratná, neboť u ní dochází k odstranění DNA, která leží mezi J_H genem a příslušně spojovaným C_H genem (vznikají tedy například IgM^-IgG^+ nebo IgM^-IgA^+ B buňky). Nejdůležitější faktory, které

ovlivňují změnu izotopu B buňky, jsou T lymfocyty a cytokiny jimi produkované (Hardy a Hayakawa 2001, Hentges a spol., 2004, Šinkora a spol., 2003, Wang et Clarke, 2004).

3.9 ONTOGENEZE HEMATOPOEZY A MÍSTA VÝVOJE LYMFOCYTŮ U PRASAT

První orgán, který generuje hematopoetické kmenové buňky je, stejně jako u dalších zvířecích druhů, extra-embryonální žloutkový vak (Šinkora a spol., 2003). Žloutkový vak však během embryonální ontogeneze zaniká (u prasat kolem DG27) a jeho funkce přecházejí do fetálních jater, která u prasat v poměru s velikostí plodu dosahují největší velikosti zhruba v DG35. Fetální játra fungují jako hematopoetický orgán minimálně do DG50, nicméně během DG40 se hematopoetická aktivita přesouvá do kostní dřeně, které, stejně jako u člověka a myši, zůstává od DG45 hlavním hematopoetickým orgánem (Šinkora a spol., 2003). Lymfopoetická aktivita v kostní dřeni dosahuje vrcholu mezi DG60 - DG80 a během této periody je vytvořena většina lymfoidních buněk vyvíjejícího se embrya. Výskyt a vývoj B lymfocytů a NK buněk kopíruje výskyt hematopeézy, protože tyto buněčné typy jsou jejich přímým produktem. Prekurzory T lymfocytů vznikají také v místech hematopeetických aktivit, nicméně tyto prekurzory migrují do brzlíku, kde dochází k jejich dalšímu vyzrávání (Šinkora a spol. 2003). Protože hematopoetická aktivita probíhá ve dvou vlnách (první ze žloutkového vaku a fetálních jater mezi DG20-DG50 a druhá z kostní dřeně od DG45) je i brzlík osidlován dvěma vlnami T lymfatických prekurzorů.

Prasata jsou spárkatí savci stejně jako ovce, skot či koně, kteří jsou historicky řazeni ke skupině živočichů u které nedochází k vývoji B lymfocytů v kostní dřeni po celý život, ale kteří v pozdní embryonální ontogenezi a po narození používají pro vývoj a rozšíření B lymfocytů specifické orgány zadního střeva. Do této skupiny patří například kuřata, která používají Fabriciovu burzu (Glick, 1956) nebo králíci, kteří používají sacculus rotundus a apendix (Lanning a spol., 2000). U kopytníků je tímto orgánem oblast folikulů rozprostřených v oblasti kyčelníku, oblasti známe jako ileální Payerské pláty (IPP, Yasuda a spol. 2006). Tyto specifické orgány jsou podobné Fabriciově burze ptáků a diverzifikace B buněk zde pravděpodobně probíhá obdobným způsobem pomoci mechanismů genové konverze nebo somatických hypermutací (Ekman a spol., 2010; Paul, 2003, Toman a spol., 2009).

3.10 ROZDĚLENÍ ŽIVOČICHŮ DLE MÍSTA VÝVOJE PRIMÁRNÍHO PROTILÁTKOVÉHO REPERTOÁRU

U teplokrevných obratlovců existují dva základní způsoby vývoje B lymfocytů. Na jedné straně stojí živočichové využívající kostní dřeň (tzv. BM skupina z angl. bone marrow), ve které dochází v průběhu celého života k tvorbě a obnově B lymfocytů z HSCs. Tento model vznikl studiem myší a platí také pro lidi (Paul a spol., 2003). U těchto živočichů je zdrojem primárního repertoáru protilátek převážně V(D)J přeskupení a receptorový editing. Druhý způsob tvorby B lymfocytů je založen na využití druhově specifických primárních lymfatických orgánů umístěných v oblasti zadního střeva (tzv. GALT skupina z angl. gut-associated lymphoid tissue) v kterých dochází k tvorbě plně rozvinutého primárního B buněčného repertoáru. Modelovým zástupcem tohoto vývoje je kuře, ale řadí se sem také například králík nebo kopytníci, někdy také kytovci a šelmy (Mage a spol., 2006; Weill et Reynaud, 1998). U těchto živočichů je zdrojem primárního repertoáru protilátek převážně genová konverze a náhodné mutace.

Výskyt genové konverze u ptáků je dlouhodobě známá a dobře probádaná skutečnost (Michael a Ratcliffe, 2006), která však nebyla nikdy zcela jasně potvrzena u dalších zvířecích druhů, které jsou do GALT skupiny zařazovány. To, že jsou do GALT skupiny zařazovány i králíci a kopytníci včetně prasat je dáno několika nápadně shodnými nálezy, které jsou odlišné od BM skupiny a jsou shodné pro GALT skupinu (Butler, 1997, Yasuda a spol., 2006):

1. Všichni zástupci GALT skupiny mají specializované orgány zadního střeva, které chybí u myší a lidí. U ptáku jde o Fabriciovu burzu, u králíků o sacculus rotundus (přechod mezi ileem a slepým střevem na terminálním konci Peyerových plátů) a u kopytníků jde o ileální Payerské pláty (IPP), které jsou rozdílné od jejunálních Payerských plátů (JPP) jimiž disponují všechny živočišné druhy. Na rozdíl od JPP jsou IPP kontinuální, objevují se v ontogenezi později, jsou dominantní během brzkého postnatálního života, zanikají několik týdnů až měsíců po narození, jsou lokalizovány v terminální části ilea v blízkosti apendixu a jsou vyplněné téměř výhradně B lymfocyty.

2. Všichni zástupci GALT skupiny mají omezený počet V_H genů, které patří pouze do jedné rodiny se stejnou úvodní sekvencí genů. To je základní předpoklad pro fungování genové konverze, která může pracovat pouze na homologních templátech. U prasat jde o rodinu genů shodnou s V_H3 geny u lidí.

3. Všichni zástupci GALT skupiny mají omezenou kombinační tvorbu primárního repertoáru protilátek díky omezenému počtu V, D a J subgenů. Z tohoto důvodu se předpokládá alternativní mechanismus tvorby repertoáru jako je genová konverze. U prasat je pro přeskupování využíváno zejména 7 hlavních V_H subgenů (V_HA, V_HB, V_HC, V_HE, V_HF, V_HX a V_HY), dva D_H subgeny (D_HA a D_HB) a pouze jeden J_H subgen.

4. U všech zástupců této skupiny byly u zralých buněk nalezeny chimerické V geny s kombinačně vyměněnými CDR1 a CDR2 oblastmi, které připomínají produkty genové konverze.

3.11 ZDŮVODNĚNÍ ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Třicet let staré studie Reynoldse a Morrise na ovcích naznačily, že IPP jsou primární lymfatický orgán a mají stejnou funkci jako Fabriciova bursa u ptáků (Reynolds a Morris, 1983). Následující studie převzaly tuto myšlenku a nekriticky jí opakovaly ve svých závěrech. Tato teorie je založena na nálezech, že (1) chirurgické odstranění IPP vede k snížení B buněk a k B buněčné deficienci (Gerber a spol., 1986), (2) B buňky se vyvíjejí v IPP nezávisle na antigenu (Reynolds et Morris, 1984), (3) systémové odstranění IgM^+ B buněk u fetáních jehňat zamezuje zformování IPP (Press a spol., 1996), (4) IPP vykazují vysokou proliferační aktivitu (Reynolds, 1987), (5) většina B buněk v IPP umírá (Reynolds, 1986, Motyka et Reynolds, 1991), (6) diverzifikace repertoáru protilátek probíhá v IPP pomocí somatické hypermutace (Reynaud a spol., 1991) nebo genové konverze (Parng a spol., 1996), (7) IPP zanikají během postnatálního života stejně jako Fabriciova burza (Reynolds a Morris, 1983) a (8) enzym AID (activation-induced cytidine deaminase), který zprostředkovává genovou konverzi, somatické hypermutace a změnu izotypu protilátek byl nalezena v IPP (Yasuda a spol., 2006).

Díky anatomické podobnosti IPP u ovcí a prasat a jistým nálezům, které se shodovali u všech živočišných druhů skupiny GALT (viz. výše) byla teorie o funkci IPP nekriticky rozšířena i na další živočišné druhy včetně prasat. Další nálezy se však s tuto teorii neshodovaly. Za prvé bylo zjištěno, že k vývoji B buněk u prasat dochází pravděpodobně v kostní dřeni stejně jako u myší a lidí (Šinkora a spol., 1998b a 2003). Za druhé bylo zjištěno, že VDJ genové chiméry podobné genové konverzi lze získat jako artefakt PCR, která je nutná pro zmnožení genů (Šinkora a spol., 2000). Za třetí bylo zjištěno, že spojováním V(D)J genů v CDR3 oblasti lze získat dostatečnou rozmanitost repertoáru při použití pouze jednoho funkčního V_H genu (Xu a spol., 2000). Různorodost v

CDR3 oblasti je proto dostatečná k tvorbě plně rozvinutého primárního repertoáru protilátek a proto není důvod, proč by prasata měli v evoluci vyvinout genovou konverzi. Za čtvrté bylo prokázáno, že jiné GALT živočišné druhy jako například ovce mají daleko větší repertoár lehkých řetězců a tedy postrádají genovou konverzi (Jenne a spol., 2003). V souladu s tím sekvenovaní prasečího genomu ukázalo, že všechny CDR1–CDR2 chiméry mají své protějšky na úrovni DNA (Eguchi-Ogawa a spol., 2010). Nakonec za páté, zevrubná analýza všech nálezů, na kterých je založena teorie o IPP jako místa primárního vývoji B buněk, uvedených v předchozím odstavci v bodech 3-8, naznačila, že nejde o přímé důkazy B lymfopoetické aktivity v IPP. Tyto nálezy mohou být také vysvětleny skutečností, že B lymfocyty, které jsou generovány v kostní dření, migrují do sekundárních lymfatických orgánů včetně IPP kde dochází k jejich sekundárnímu vyzrávání závislém na antigenu. Toto vyzrávání zahrnuje proliferaci, selekci, apoptosu, somatické hypermutace, izotypový přesmyk a změnu povrchového fenotypu.

Nejistota ohledně všeobecně rozšířené teorie a důvody pochybností o její správnosti nás vedli k sérii experimentů, které mají vysvětlit funkci IPP u prasat a zjistit distribuci lymfocytů ve střevě u bezmikrobních a kolonizovaných selat.

4. CÍLE PRÁCE

1. Zdokumentovat výskyt a zastoupení lymfoidních buněk skrze střevo prasat a zjistit zda tento výskyt je nebo není závislý na kolonizaci střeva.

2. Zjistit, zda existuje výrazný rozdíl mezi ileální a jejunální oblastí tenkého střeva který by naznačoval, že prasata používají IPP jako specifické oblasti střeva pro vývoj B buněčného repertoáru.
3. Porovnat specifické komponenty GALT (IEL, LPC, IPP, JPP), zjistit vliv kolonizace střeva na tyto komponenty a zjistit v kterých oblastech střeva dochází k izotypovému přesmyku imunoglobulinových tříd jako typického jevu provázející sekundární vývoj protilátkového repertoáru.

4.1 ZDŮVODNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE

1. U teplokrevných obratlovců existují dva základní způsoby vývoje B lymfocytů. Na jedné straně je skupina BM využívající celoživotně kostní dřeň. Druhý způsob tvorby B lymfocytů je založen na využití GALT k tvorbě plně rozvinutého primárního B buněčného repertoáru (Yasuda a kol. 2006). Prase je historicky řazeno ke skupině GALT, avšak některé další nálezy zpochybňují toto zařazení. Je proto otázkou zda prasata opravdu patří do skupiny GALT a zda používají IPP k tvorbě primárního B buněčného repertoáru nezávislého na výskytu antigenu. Analýza jednotlivých lymfocytárních subpopulací u bezmikróbních selat ve srovnání s konvenčními selaty by měla prokázat zda kolonizace střeva ovlivňuje celé tenké střevo či pouze jeho vybrané oblasti. Taková analýza by též měla prokázat, zda se IPP chovají odlišně v závislosti na kolonizaci střeva a zda vývoj B lymfocytů v IPP je závislý nebo nezávislý na přítomnosti antigenů. Navíc analýza všech základních populací lymfocytů a jejich subpopulací naznačí význam jednotlivých typů lymfocytů při kolonizaci střeva.
2. Místa primárního vývoje B lymfocytů jsou charakteristické výskytem nezralých a naivních B buněk, jejichž vývoj je nezávislý na přítomnosti externích antigenů. Na druhé straně jsou sekundární lymfatické orgány, které jsou charakteristické výskytem efektorových B buněk. Výskyt a existence efektorových B lymfocytů je závislá na přítomnosti antigenu. Jestliže je vývoj v určitých oblastí střeva jako jsou IPP závislý na výskytu antigenů, zatímco jiné oblasti jako JPP jsou nezávislé, měl by být patrný rozdíl ve výskytu efektorových a naivních B buněk v závislosti na stupni kolonizace střeva.

Navíc výstupy tohoto cíle zodpoví na otázku jak jsou jednotlivé populace lymfocytů distribuovány skrze celé střevo a zda distribuce lymfocytů je závislá nebo nezávislá na kolonizaci střeva.

3. U skupiny živočichů využívající GALT k tvorbě primárního B buněčného repertoáru jsou specifické orgány zadního střeva primárními lymfatickými centry, ve kterých dochází k vzniku primárního imunoglobulinového spektra. Toto primární spektrum je charakteristické rozrůzněním protilátek na úrovni IgM. U sekundárních lymfatických orgánů dochází k vývoji sekundárního imunoglobulinového spektra, na kterém se podílí somatická hypermutace, revize BCR a izotypový přesmyk imunoglobulinových tříd. Somatické hypermutace připomínají náhodné mutace generované při formování primárního protilátkového repertoáru a proto nemohou být jednoznačně použity k identifikaci vývoje sekundárního protilátkového repertoáru. Obdobná situace platí pro revizi BCR, která připomíná editaci BCR. Při izotypovém přesmyku tříd však dochází ke změně typu těžkého řetězce a tedy i ke změně imunoglobulinové třídy, která není přítomná v primárních lymfatických centrech. Pokud jsou jisté oblasti střeva místa vývoje B lymfocytů u prasat, pak by v těchto oblastech mělo být přítomno pouze imunoglobulinové spektrum typu IgM a nemělo by docházet k izotypovému přesmyku. Na druhé straně by měly být oblasti střeva reprezentující sekundární lymfatické orgány, kde by měla být patrná přítomnost izotypového přesmyku, a to zejména na IgA, který je typický pro střevní imunitu.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 ZVÍŘATA A ODBĚR VZORKŮ

5.1.1 Experimentální zvířata a chirurgické procedury

Experimentální zvířata použitá v této diplomové práci byla (1) prasata odvezená křížením plemene Minnesota s vietnamsko-asijsko-malajsijskými prasaty interního chovu laboratoře MBÚ AV ČR, v.v.i., (2) prasata plemene Česká bílá ušlechtilá získaná z jatek. Mezi těmito dvěma plemeny nebyly nalezeny signifikatní rozdíly co se týče distribuce studovaných lymfocytů. Konvenční (CV) i bezmikrobní (GF) selata byla utracena v celkové isofluoranové anestézii vykrvením pomocí kardiální punkce. Bezmikrobní selata byla získána z prasnic hysterektomií a umělým porodem provedenými 112-tý den gestace do sterilních izolátorů pomocí dříve popsané technologie (Minatis a Jol, 1978). Po narození byla bezmikrobní selata udržována v izolátorech za bezmikróbních podmínek, které byly přísně kontrolovány interním bakteriologickým vyšetřením. Selata byla vyživována sterilním upraveným 6% kravským mlékem. Veškeré pokusy na zvířatech byly prováděny pod dohledem proškolené osoby a probíhaly podle projektů pokusů schválených etickou komisí Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. na základě ochrany zvířat proti týrání.

5.1.2 Experimentální design

V experimentální skupině CV selat bylo zkoumáno 15 jedinců ve věku od 1-6 týdnů a ve skupině GF selat bylo zkoumáno 7 jedinců ve věku od 1-8 týdnů. Po eutanázii selete bylo odebráno celé tenké střevo mezi žaludkem a apendixem. V celé diplomové práci je střevo číslováno ve směru od terminálního ilea (vzorek č. 1) k duodenu (vzorek č. 20). Střevo bylo nejprve rozděleno tak, že byl odebrán úsek ilea až po konec kontinuálních Payerských plátů (IPP). Tento úsek byl rozdělen na tři stejně dlouhé úseky (vzorky 1-3). Ze vzorku č. 3 byla odebrána část IPP pro analýzu PCR. Nepozorovali jsme, že by odebrání krátkého úseku IPP mělo závažný vliv na výsledky.

Následující oblast střeva již neobsahovala kontinuální ileální Payerské pláty, ale pouze diskontinuální jejunální Payerské pláty. Je nutno podotknout, že hranice mezi ileem a jejunem není u prasete anatomicky přesně definována a z historiského pojetí a v pojetí i této práce je za ní považována oblast v kterém se přestávají vyskytovat kontinuální Payerské pláty a začínají se objevovat diskontinuální Payerské pláty. Z následující části

jejuna jsme vystřihli dvě přibližně stejně dlouhé části (vzorky 4 a 5), přičemž jedna z nich obsahovala diskrétní Payerský plát (JPP) a druhá jej neobsahovala. Délka těchto dvou úseků se výrazně nelišila od zbývajících vzorků. Tyto dva vzorky byly použity na speciální analýzu závislosti přítomnosti lymfocytů a jejich subpopulací na přítomnosti Payerského plátu. V této analýze byl Payerský plát u vzorku s Payerským plátem beze zbytku vystřihnut (označeno jako vzorek s PP – vzorek, který původně obsahoval PP), zatímco vzorek bez Payerského plátu byl analyzován tak, jak byl (označeno jako vzorek bez PP – vzorek, který neobsahoval PP). Zbylá část střeva byla rozdělena na 15 stejně dlouhých úseků (vzorky 6 až 20). Vzorky 6-18 byly považovány za jejunum, u vzorku 19 byl pozorován těsný styk tenkého střeva s tlustým střevem a poslední vzorek 20 rerezentoval duodenum.

5.2 PŘÍPRAVA LYMFOCYTŮ

5.2.1 Izolace směsi lymfocytů z tenkého střeva prasete

Vzorky tenkého střeva byly v Petriho miskách pomocí sérologické pipety obráceny vnitřní stranou ven, důkladně mechanicky zbaveny zbytků natrávenin a promyty 4-5 krát v PBS (5 min., 400x g, 4°C). Intaktní tkáň byla přenesena do čisté 50 ml zkumavky a natrávena pomocí trávicího média (RPMI-1640 (PAA), 100 U/ml kolagenáza typu IV (Sigma-Aldrich), 2% fetální telecí sérum (PAA)) předehřátého na 37°C v celkovém objemu 20-30 ml za stálého míchání na orbitální třepačce po dobu 60 minut při 37°C. Vzniklá suspenze buněk byla přefiltrována skrze nylonovou tkaninu s velikostí pórů 70 μm (Cell Strainer, BD Falcon) do čisté 50 ml zkumavky. Buňky byly pomocí centrifugace 2 krát promyty v PBS (5 min., 400x g, 4°C). Po promytí byly buňky resuspendovány ve 3 ml 80% roztoku SIP (SIP je roztok Percollu (GE Healthcare) naředěn 1:10 pomocí 10X PBS, na 80% objemových procent byl naředěn pomocí 1X PBS). Do čistých 14 ml zkumavek byly naneseny 4 ml 40% roztoku SIP, který byl poté podvrstven suspenzemi buněk jednotlivých vzorků v 80% roztoku SIP. Separace lymfocytů probíhala centrifugací bez brždění (30 min., 880x g, 21°C). Po dokončení centrifugace byly odebrány prstence lymfocytů jednotlivých vzorků, které vznikají na přechodu 40%/80% SIP. Získané suspenze lymfocytů byly 3 krát promyty v PBS, poprvé 10 minut, 600x g, 21°C a poté ještě dvakrát při 400x g, 4°C. Orientační počet buněk byl stanoven počítáním v počítací komůrce.

5.2.2 Izolace intraepiteliálních lymfocytů (IEL) a lymfocytů z *lamina propria* (LPC)

Vzorky tenkého střeva byly v Petriho miskách pomocí sérologické pipety obráceny vnitřní stranou ven, důkladně mechanicky zbaveny zbytků natrávenin a promyty 4-5 krát v PBS. K promytým vzorkům bylo přidáno 30-40 ml roztoku PBS, do kterého bylo přidáno 1 mM DTT (Sigma-Aldrich) a 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) a který byl předehřát na 37°C. 50 ml zkumavky se vzorky byly umístěny na orbitální třepepačku a byly inkubovány 15 minut při 37°C. Poté byl slit supernatant do čisté 50 ml zkumavky a uschován. Ke tkáni byl přidán nový roztok s DTT a zkumavky byly opět umístěny na třepačku. Takto byly získány 4 frakce, intraepiteliální lymfocyty (IEL) byly obsaženy v posledních dvou frakcích. Zbytky tkáně byly použity pro izolaci lymfocytů z lamina propria. Suspenze buněk byly přefiltrovány přes nylonovou tkaninu s velikostí pórů 70 μm. Vzorky byly 2 krát promyty v PBS pomocí centrifugace (5 min., 400x g, 4°C). Promyté buňky byly přečištěny přes Percollový gradienty stejným způsobem jako v případě izolace lymfocytů (kapitola 4.2.1.). Orientační počet buněk byl stanoven počítáním v počítací komůrce.

5.2.3 Izolace buněk z *lamina propria*

K zbylé tkáni po třepání s roztokem DTT bylo přidáno trávicí médium (RPMI-1640 (PAA), 100 U/ml kolagenáza typu IV (Sigma-Aldrich), 2% fetální telecí sérum (PAA)) předeřáté na 37°C a zkumavky byly umístěny na orbitální třepačku na 60 minut při 37°C. Buňky byly pomocí centrifugace 2 krát promyty v PBS (5 min., 400x g, 4°C). Po promytí byly přečištěny přes Percollový gradienty stejným způsobem jako v případě izolace lymfocytů (kapitola 4.2.1.). Orientační počet buněk byl stanoven počítáním v počítací komůrce.

5.2.4 Izolace lymfocytů z Payerských plátů

Ze střeva byly opatrně vystřiženy Payerské pláty a důkladně promyty v PBS. Pomocí filtru s nylonouvou membránou o velikosti pórů 70□m byla tkáň homogenizována a převedena do 50 ml zkumavky. Suspenze ve zkumavkách byly 2-3 krát promyty v PBS (5 min., 400x g, 4°C). Orientační počet buněk byl stanoven počítáním v počítací komůrce.

5.2.5 Počítání buněk

Počítání buněk bylo prováděno mikroskopicky pomocí počítací komůrky a pomocí průtokového cytometru. Pro počítání v počítací komůrce bylo na mikrotitrační desku pro

každý vzorek (10 µl) odebráno 190 µl Türkova roztoku (Merck) a směs byla důkladně promíchána pomocí pipety. Dále bylo ze směsi odebráno 10 µl a to bylo opatrně vypuštěno pod krycí sklíčko počítací komůrky. Buňky byly počítány v 50-ti čtvercích.

5.3 FENOTYPIZACE BUNĚK

5.3.1 Značení buněk pro průtokovou cytometrii

Pro značení buněk bylo využito nepřímé imunodetekce. Suspenze buněk (v koncentraci $2x10^7$/ml) byla značena v 96-ti jamkové mikrotitrační desce. Nejprve byly buňky inkubovány 15 min při 4°C se směsí primárních protilátek různých izotypů. Poté byly buňky promyty 3 krát ve FACS gelu (3 min., 340x g, 4°C). Následovala inkubace buněk se směsí sekundárních protilátek, které byly namířeny proti různým izotypům primárních protilátek . Byly použity čtyři různé sekundární protilátky konjugované s různými fluorochromy. Suspenze buněk se sekundárními protilátkami byla inkubována 15 min při 4°C, poté byly buňky 3 krát promity od nenavázaných protilátek ve FACS gelu (3 min., 340x g, 4°C). Množství všech použitých protilátek bylo použito na základě experimentálně stanoveného optimálního titru pro silný signál bez falešného pozadí. Jako negativní kontroly byly využity myší monoklonální protilátky namířené proti krysím antigenům, které byly namířeny proti stejným izotypům jako použité kozí protilátky proti myším antigenům. K promytým a resuspendovaným buňkám bylo přidáno 50 µl FACS gelu a celý objem vzorků byl převeden do připravených speciálních zkumavek. Takovéto buňky jsou připraveny na měření průtokovým cytometrem.

5.3.2 Průtoková cytometrie

Pro měření značených suspenzí buněk byl použit přístroj FACSCAlibur (Becton Dickinson). Buňky byly značeny sekundárními protilátkami konjugovanými se 4 různými fluorochromy, FITC, PE, PE/Cy5 a APC. Pro odečet spektrálního překryvu jednotlivých fluorochromů byla použita elektronická kompenzace.

Pro každý vzorek bylo měřeno 300 až 700 tisíc buněk. Analýza dat získaných z průtokové cytometrie byla prováděna pomocí softwarového programu PCLysis (Becton Dickinson).

5.3.3 Sortování buněk

Pro PCR analýzu byly nutné čisté populace B buněk s určitým fenotypem. Pro separaci čistých populací bylo využito sortování buněk z ileálních a jejunálních payerských plátů a také směsi lymfocytů z *lamina propria*. Buňky byly značeny pomocí protilátek stejným způsobem jako pro fenotypizaci průtokovou cytometrií. K sortování buněk byl použit přístroj FACSAriaIII (Becton Dickinson). Buňky byly sortovány do sterilních zamražovacích zkumavek v počtu 10, 30 a 50 tisíc buněk. Pro danou analýzu bylo vždy použit stejný počet buněk pro každou analyzovanou subpopulaci. Čistota sortovaných buněk byla kontrolována reanalýzou sortovaných buněk v separátních sortech. Po dokončení sortování byly buněčné sorty stočeny (15 min., 440x g, 4°C), pelet byl resuspendován v 0,5 ml činidla TRI Reagent (Sigma-Aldrich) a směs byla zamražena na -20°C.

5.4 PRÁCE S NUKLEOVÝMI KYSELINAMI

5.4.1 Izolace RNA

Výchozí vzorek byla zamražená suspenze buněk v 0,5 ml TRI Reagent. Ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl chloroformu (Sigma-Aldrich) a každý byl intenzivně protřepán na vortexu cca 30 vteřin. Dále byly vzorky vloženy do předchlazené centrifugy a stočeny (10 min., 22000x g , 4°C). Po centrifugaci byl obsah zkumavek rozdělen na dvě frakce, čirou a růžovou. Velice opatrně byla odebrána vrchní čirá vrstva, která nesměla být kontaminována spodní růžovou frakcí. Zkumavky s růžovou frakcí byly uschovány do mrazáku pro izolaci DNA (viz kapitola 4.4.2.). Ke každému vzorku RNA bylo přidáno 250 µl isopropylalkoholu (Sigma-Aldrich), vzorky byly protřepány a nechány 15 minut stát na ledu. Následně byly stočeny (10 min., 22000x g, 4°C). Po stočení byly opatrně odebrány supernatanty a vyhozeny. K peletům byl přidán 1 ml 75% ethanolu, vzorky byly protřepány a stočeny (10 min., 22000x g, 4°C). Znovu byl opatrně odebrán supernatant a byl vyhozen. Zkumavky byly nechány s otevřeným víčkem tak, aby vyschl pelet. Dle množství RNA (v závislosti na počtu nasortovaných buněk) byl přidán roztok TE, 5-10 µl.

5.4.2 Izolace DNA

Pro izolaci buněčné DNA bylo využito zamražené frakce TRI Reangent, která nebyla využita pro izolaci RNA. Ke spodní růžové frakci bylo přidáno 150 µl 100%

ethanolu a vzorek byl důkladně promíchán na vortexu. Zkumavky byly následně stočeny (5 min., 1800x g, 4°C). Po centrifugaci byl opatrně odebrán supernatant, který byl vyhozen. K peletům DNA byl následně přidán 1 ml 0,1M citrátu sodného (Sigma-Aldrich) v 10% ethanolu a tyto byly vloženy na 15 minut na míchačku. Poté byly vzorky s DNA stočeny (5 min., 1800x g, 4°C). Následně byl odebrán supernatant, který byl vyhozen. K DNA byl přidán 1 ml 75% ethanolu a byla opět vložena na 15 minut na míchačku. DNA byla stočena (5 min., 1800x g, 4°C). Supernatant byl odebrán a vyhozen. Pelety, které nemusí být viditelné byly nechány vyschnout do sucha. DNA byla naředěna pomocí 15 µl 8 mM hydroxidu sodného (Riedel-de Haën). Vzorky byly vloženy do lázně dokud se pelet nerozpustil.

5.4.3 Příprava cDNA

Komplementární cDNA byla připravena pomocí random hexamer primeru, což jsou jednovláknové šest nukleotidů dlouhé úseky nukleových kyselin, s náhodným pořadím nukleotidů a reversní transkriptázy, která dokáže za přítomnosti primerů dle RNA syntetizovat cDNA. Reakční směs pro přípravu cDNA tvořila: 9 µl vyizolované RNA a 1 µl random hexamer primer. Reakce probíhala v programu cDNA-1 (75° C, 15 min) a v tomto kroku dochází k navázání random hexamer primerů na izolovanou RNA. Po doběhnutí programu bylo ke vzorkům přidáno 5 µl syntetické směsi (na 1 vzorek: 2,1 µl dd vody; 1 µl MMLV 10x pufru; 0,1 µl DTT; 0,1 BSA; 0,5 µl dNTP; 0,2 µl RNasinu a 1 µl MMLV reverzní transkriptázy). Syntéza cDNA poté probíhala při programu cDNA-2 (37° C po dobu 59 min).

5.4.4 Polymerázová řetezcová reakce (PCR)

Pro PCR byla pro každý vzorek připravena reakční směs, která obsahovala 17,7 □l ddH2O, 2,5 µl 10x PCR buffer (bioLabs), 2 µl MgCl2 (SERVA), 1 µl dNTP (JENA bioscience), 0,3 µl od každého primeru (KDR), 0,2 µl Taq polymerázy (bioLabs) a 1 µl vzorku cDNA. Nejprve byla spuštěna primární PCR, po které následovala druhá - zaostřovací PCR. Každá PCR probíhala nejdříve 2 min při 94° C - iniciační denaturační fáze, dále v 30 cyklech amplifikace (30 sek. denaturace při 94° C, 30 sek. navazování při 61° C pro IgM, při 58° C pro IgA i IgG reakci a 60 sek. syntetické fáze při 72° C. Primární i sekundární PCR probíhala při stejném nastavení PCR cycleru.

Tab. 1 – přehled použitých primerů pro primární PCR

	Sense primer		*Anti-sense primer*	
Amplifikace	**název**	**sekvence**	**název**	**sekvence**
IgM	CH-3	gcacatgccgtccgtgta	CH-11	ccacggtcctctcggtca
IgA	CH-18	ccgtgaacgtgccctgcaa	CH-23	agaaggtgtctccctgctt
IgG	CH-24	tgcctggcctcaagcta	CH-30	ccgtccacgtaccaggaga

Tab. 2 – přehled použitých primerů pro sekundární PCR

	Sense primer		*Anti-sense primer*	
Amplifikace	**název**	**sekvence**	**název**	**sekvence**
IgM	CH-3	gcacatgccgtccgtgta	CH-10	ctgcacgaacacgtccgc
IgA	CH-19	ctaaccgccaccatcacca	CH-23	agaaggtgtctccctgctt
IgG	CH-26	aacatgtcccatatgcccag	CH-29	ccaccaccacgcacgtga

5.4.5 Agarózová elektroforéza

Pro vizualizaci amplifikované DNA a ověření správné velikosti fragmentů DNA bylo využito agarózové elektroforézy. Nejprve byl připraven 1,5% agarózový gel tak, že bylo do 100 ml TAE přidáno 1,5 g agarózy (Invitrogen) a tato směs byla zahřívána v mikrovlné troubě, aby se agaróza rozpustila. Bylo dbáno na to, aby se směs zahříváním nezačala vařit. Do téměř vychladlé směsi bylo přidáno 10 □g/ml ethidium bromidu (Sigma-Aldrich) a byla opatrně nalita do formy, kam byl připevněn hřeben. Po ztuhnutí byl hřeben vytažen a gel vložen do elektroforetické vany, která byla naplněna TAE roztokem. 10 µl vzorků z PCR bylo smícháno s 1 µl loadovacího pufru s barvou (bromfenolová modř a xenocyanol, Sigma-Aldrich) a byly nanášeny do jamek v gelu, současně byl nanesen marker velikostí fragmentů DNA (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). Elektroforéza probíhala při 120V na zhruba 20 minut. Gely po elektroforéze byly skenovány pomocí přístroje fotodokumentačního laserového systému Fujifilm.

5.5 STATISTIKA

Statistická analýza byla prováděna v programu Prism4^{TM} (GraphPad Software). Data jsou zobrazována jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM, z angl. standard error of the mean). Pro stanovení rozdílů mezi průměrnými hodnotami byl použit nepárový

t test a pro zhodnocení vzájemného rozdílu jednotlivých úseků střeva byl použit test one-way anova s Tuckeyovým podtestem. Statistické signifikance jsou vyjádřeny P hodnotami (Tab. 2). Významné rozdíly mezi jedntolivými úseky střeva jsou v grafech vyjádřeny šipkami (graf. 1, 5)

Tab. 3 – Rozlišení a označení signifikancí

Signifikance	Označení	P hodnota
Signifikantní	*	< 0,05
Silně signifikantní	**	< 0,01
Velmi silně signifikantní	***	< 0,001

5.6 ROZTOKY, ČINIDLA, MÉDIA

5.6.1 Nejčastěji používané roztoky a pufry

Deionizovaná voda - Pitná voda upravená destilací a posléze deionizací na ionto-měničové koloně Aqua osmotic typ 2. Konečná vodivost 0,1 µS/cm

PBS - Pufr obsahující v deionizované vodě rozpuštěné soli: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2 HPO_4 x10H_2 O, 1,4 mM KH_2 PO_4. Úprava pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl nebo NaOH (všechny chemikálie Sigma-Aldrich)

DTT – zásodní roztok je 1 M DTT v PBS, (Sigma Life Science)

40% roztok SIP – příprava ze 100% roztoku SIP (9 dílů Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB) a 1 díl 10x PBS) naředěním v 1x PBS, aby výsledný obsah SIP byl 40 objemových %.

80% roztok SIP – příprava ze 100% SIP naředěním v 1x PBS, aby výsledný obsah SIP byl 80 objemových %.

FACS gel – roztok 0,2% želatiny (Gelatine from cold water fish skin,Sigma-Aldrich), 0,1% NaN_3 (Sigma-Aldrich) v PBS

Trávicí médium - RPMI-1640 (PAA), 100 U/ml kolagenáza typu IV (Sigma-Aldrich), 2% fetální telecí sérum (PAA)

TE – roztok deionizované vody, 10mM Tris-HCl (pH=7,4) a 0,5 M EDTA (pH=8)

TAE – roztok deionizované vody, 20 mM ledové kyseliny octové, 40 mM Tris-base a 1 mM EDTA

75% ethanol – Ferm Kolín

100% ethanol – Ferm Kolín

5.6.2 Seznam použitých protilátek

5.6.2.1 Primární protilátky

Všechny primární protilátky jsou myší specifické proti prasečím povrchovým molekulám a byly připraveny v laboratoři MBÚ AV ČR, v.v. i. z hybridomových klonů nebo získány od spolupracujících laboratoří. Klony byly laboratoři darovány ze zahraničních zdrojů.

Tab. 4 – Seznam primárních protilátek

Specifita	Název klonu	Izotyp	Zdroj
μHC	M-160	IgG1	Butler
CD2	1038H-5-37	IgM	Simon, Huang
IgA	M1456	IgG2a	Klaus Nielsen
CD21	IAH-CC51	IgG2b	Lunney
CD8	76-2-11	IgG2a	Pescovitz
γδ TCR	PPT16	IgG2b	Yang
CD3	PPT3	IgG1	Yang
SLA DR	1038H-12-34	IgM	Simon, Huang
CD25	K231-3B2	IgG1	Stokes, Bailey
CD4	10.2H2	IgG2b	Lunney, Hammerber
CD8	76-2-11	IgG2a	Pescovitz

5.6.2.2 Sekundární protilátky

Pro značení byly použity kozí polyklonální protilátky, které jsou specifické proti různým izotypům myších protilátek (goat anti-mouse). Protilátky byly konjugovány s fluorochromy fluoresceinisothiokyanát (FITC), R-phycoerythrin (PE), tandem R-

phycoerythrin/Cyanin 5 (PE/Cy5) a allophycocyanin (APC). Sekundární protilátky byly zakoupeny od Southern Biotechnologies Associates.

Tab. 5 – Rozlišení použitých izotypů sekundárních protilátek a jejich fluorochromů

Fluorochrom	**FITC**	**PE**	**PE/Cy5**	**APC**
Izotypy	Anti-IgG1	Anti-IgM	Anti-IgG2a	Anti-IgG2b
	Anti-IgG2a	Anti-IgG1	Anti-IgG2b	Anti-IgG1
	Anti-IgM			Anti-IgG2a

5.6.3 Seznam použitých pomůcek a přístrojů

Laboratorní nádobí – kádinky, skleněné pipety, odměrné válce

Plastové pomůcky – polypropylenové zkumavky, špičky na automatické pipety, Petriho misky, polystyrenové 96-ti jamkové destičky (Maxisorp, NUNC)

Laboratorní a chirurgické nástroje – nůžky, pinzety, latexové rukavice

Automatické pipety Finpipette

Počítací komůrka

Sterilizační autokláv Chirana PS20

Ledovač Dexion

Vodní lázeň MLW

Běžné laboratorní mrazící boxy a lednice

Centrifuga Universal 32 R, Hettlich zentrifugen

Třepačka Titromix T1200B, Tool

Termální box TCH100, Laboratorní přístroje Praha

Třepačka Orbital Shaker OS-20, Biosan

Mikroskop Olympus IX 71

Bezpečnostní box II. třídy Safemate 1.5, Bioair

Průtokový cytometr FACSCalibur, Becton Dickinson

FACSAriaIII, Becton Dickinson

Míchačka Mix 30, Tool

Digestoř MGP

PCR Cycler XP Cycler, Bioer

PCR Cycler T Gradient Thermoblock, Biometra

Analytické váhy

Váha 440-49N, KERN

Mikrovlnná trouba Domo

Elektroforetická vana MP 300V, Major Science

Fotodokumentační laserový systém- FLA-7000, Fujifilm

Chirurgický sál

Laboratoř pro mikrobiologickou kontrolu

6. VÝSLEDKY

6.1 DISTRIBUCE POPULACÍ LYMFOCYTŮ NAPŘÍČ TENKÝM STŘEVEM SELETE

6.1.1 Distribuce αβ T lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty

Obrázek 2A ukazuje, že zastoupení αβ T lymfocytů u GF a CV selat je napříč tenkým střevem téměř rovnoměrné. Při porovnání GF a CV selat však zjišťujeme, že αβ T lymfocyty jsou prokazatelně více zastoupeny u bezmikrobních selat.

6.1.2 Distribuce γδ T lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty

Zastoupení γδ T lymfocytů (obr. 2B) v tenkém střevu je podobné αβ T lymfocytům a u GF a CV selat je rovnoměrné skrze tenké střevo. Stejně jako u αβ T lymfocytů jsou také γδ T lymfocyty podstatně více zastoupeny u GF selat v porovnání s CV selaty.

6.1.3 Distribuce B lymfocytů skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty

Obrázek 2C ukazuje, že nejvyšší procentuální zastoupení B lymfocytů u GF selat pozorujeme v oblasti terminálního ilea (vzorky 1-3) a následně dochází k jejich výraznému poklesu (vzorky 6-10). V oblastech vzorků 11-18 je mírný nárůst B lymfocytární populace a v části duodena (vzorky 19-20) pozorujeme mírný pokles v jejich zastoupení.

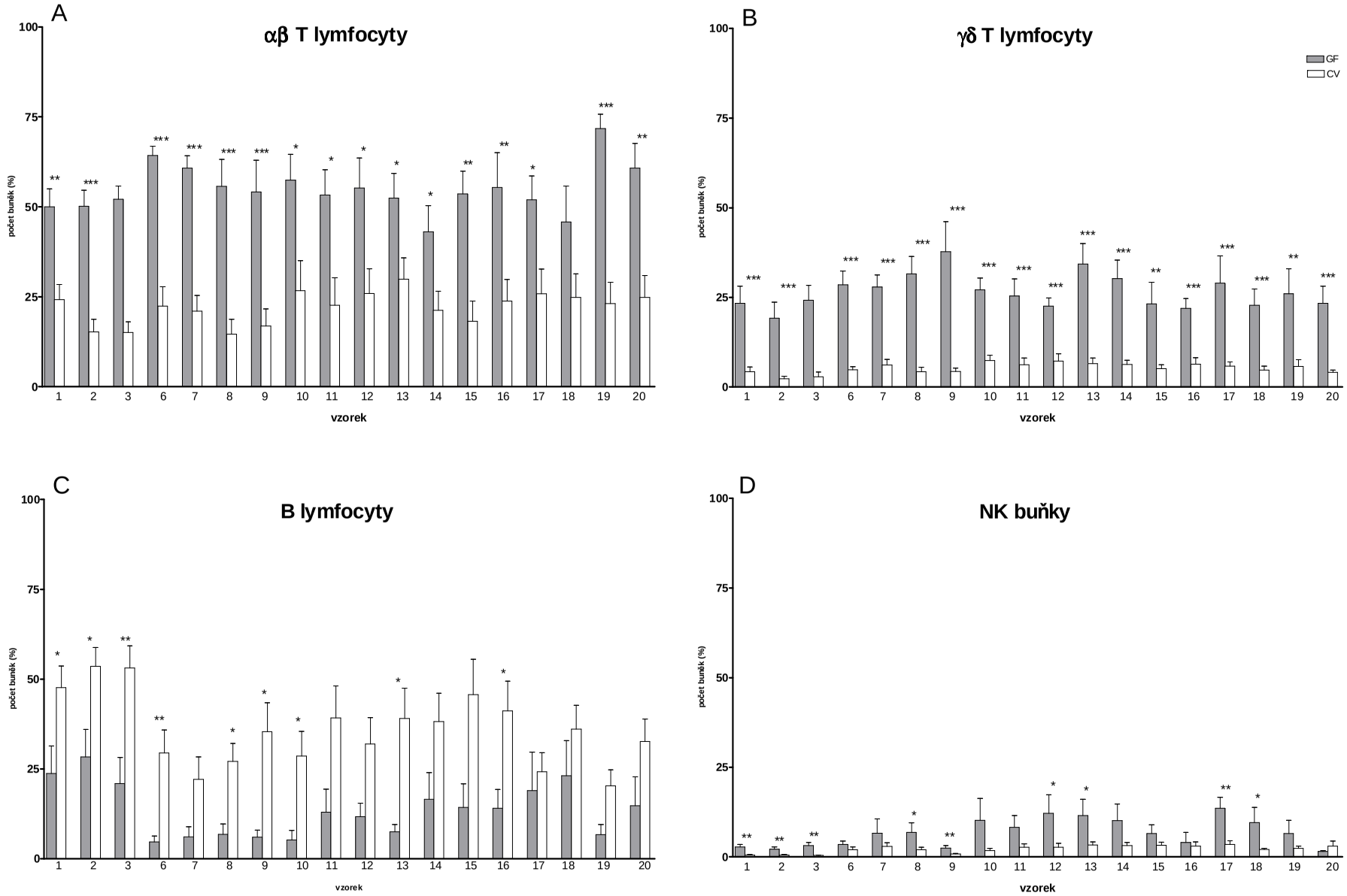
Trend v rozložení populace B lymfocytů u GF selat je zachován u CV selat s tím rozdílem, že v části duodena nedochází k výraznějšímu poklesu jejich počtu jako je tomu u GF selat (obr. 2C).

B lymfocyty jsou jedinou populací lymfocytů, která má výrazně vyšší zastoupení u CV selat v porovnání s GF selaty (obr. 2C).

6.1.4 Distribuce NK buněk skrze tenké střevo selete a porovnání GF selat s CV selaty

NK buňky jsou v oblasti tenkého střeva obecně velmi vzácné (obr. 2D). Srovnání CV a GF selat odhalilo, že stejně jako u αβ a γδ T lymfocytů je u GF selat vyšší zastoupení NK buněk.

U GF selat, kde je zastoupení NK buněk vyšší bylo zjištěno, že v oblasti středního jejuna (vzorky 10-15) a blízko duodena (vzorky 18-20) je počet NK buněk vyšší a to až o 15%.


A
αβ T lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek
B
γδ T lymfocyty
GF
CV
počet buněk (%)
vzorek
C
B lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek
D
NK buňky
počet buněk (%)
vzorek

Obr. 2 – *Distribuce hlavních populací lymfocytů ve střevu GF a CV selat*

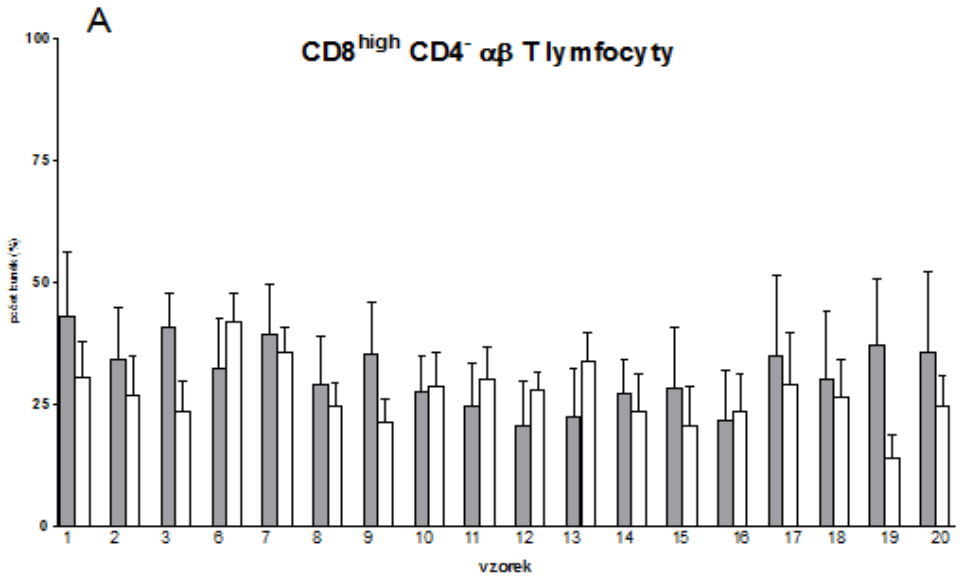
Grafy znázorňují distribuci hlavních populací lymfocytů napříč tenkým střevem u GF (šedé sloupce) a CV (bílé sloupce) selat pro (A) αβ T lymfocyty, (B) γδ T lymfocyty, (C) B lymfocyty a (D) NK buňky. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé části střeva, kde 1 je úsek nejblíže tlustému střevu a 20 je vzorek nejblíže žaludku. Vzorky 4 a 5 nejsou zahrnuty, protože tyto části střeva byly použity pro jinou analýzu. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty.

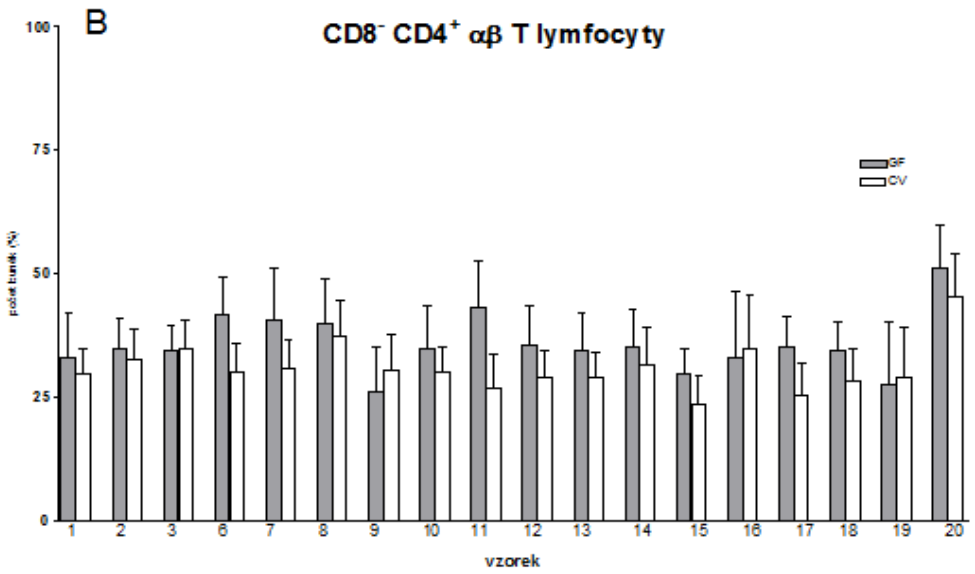
6.2 DISTRIBUCE SUBPOPULACÍ ZÁKLADNÍCH TYPŮ LYMFOCYTŮ V TENKÉM STŘEVU SELETE

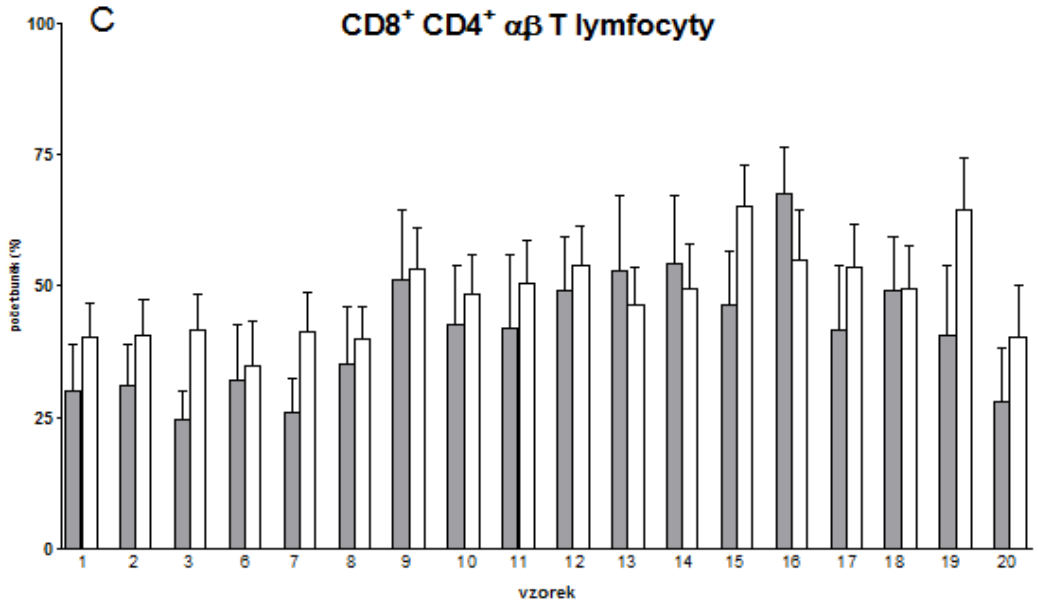
6.2.1 Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat

V této kapitole se budeme zabývat rozmístěním subpopulací αβ T lymfocytů ve střevu selete. Na základě povrchových molekul byly αβ T lymfocyty rozlišeny na 3 subpopulace: cytotoxické T_C ($CD8^{high}$ $CD4^-$), pomocné T_H ($CD8^{—}$ $CD4^+$) a efektorové/paměťové pomocné T_H ($CD8^+$ $CD4^+$).

Rozložení všech subpopulací αβ T lymfocytů ve střevu selat je po jeho délce rovnoměrné a nevykazuje statisticky výrazné rozdíly mezi selaty bez antigenní stimulace a selaty vystavenými mikroorganismům (obr. 3A-C).







Obr. 3 - Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů ve střevu GF a CV selat.

Grafy znázorňují distribuci αβ T lymfocytů napříč tenkým střevem u GF (šedé sloupce) a CV (bílé sloupce) selat pro (A) $CD8^{high}$ $CD4^{-}$ αβ T lymfocyty, (B) $CD8^{-}$ $CD4^{+}$ αβ T lymfocyty, (C) $CD8^{+}$ $CD4^{+}$ αβ T lymfocyty. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé části střeva, kde 1 je úsek nejblíže tlustému střevu a 20 je vzorek nejblíže žaludku. Vzorky 4 a 5 nejsou zahrnuty, protože tyto části střeva byly použity pro jinou analýzu. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty.

6.2.2 Distribuce subpopulací γδT lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat

V následující části se budeme věnovat subpopulacím γδ T lymfocytů jejichž funkce doposud nebyly přesně stanoveny. Rozlišení subpopulací na základě exprese CD2 a CD8 povrchových molekul je všeobecně uznávané rozdělení γδ T lymfocytů u prasat a skotu.

6.2.2.1 Distribuce γδ $CD2^{+}CD8^{-}$ T lymfocytů

U GF selat je ze získaných hodnot patrné, že úroveň zastoupení $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocytů (obr. 4A) je plně srovnatelná v zadní části tenkého střeva (vzorky 1-13) s mírným zvýšením v přední části tenkého střeva (vzorky 14-20). Nicméně porovnání signifikance neprokázalo, že by šlo o statisticky významný rozdíl. U CV selat je rozložení této subpopulace skrze celou délku tenkého střeva zcela srovnatelné (obr. 4A).

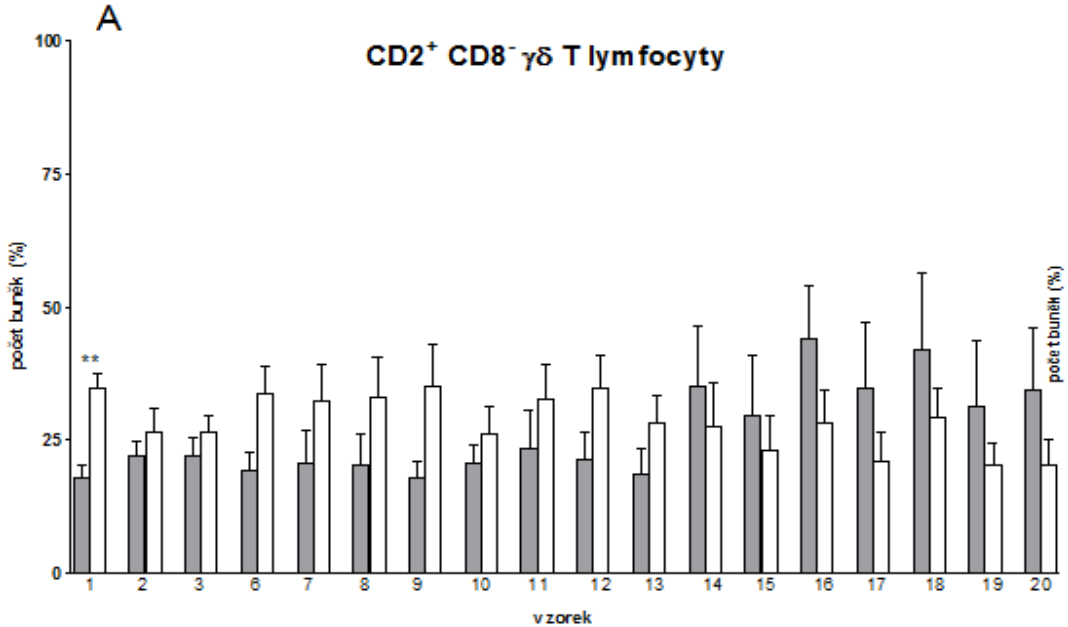
Při srovnání GF a CV selat se zdá, že v zadní části střeva (vzorky 1-13) je u CV selat vždy vyšší zastoupení $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocytů než u GF selat, zatímco opak je pravdou pro přední část tenkého střeva (vzorky 14-20). Statistické porovnání však potvrdilo, že statisticky významný rozdíl lze nalézt pouze v části terminálního ilea (vzorek 1).

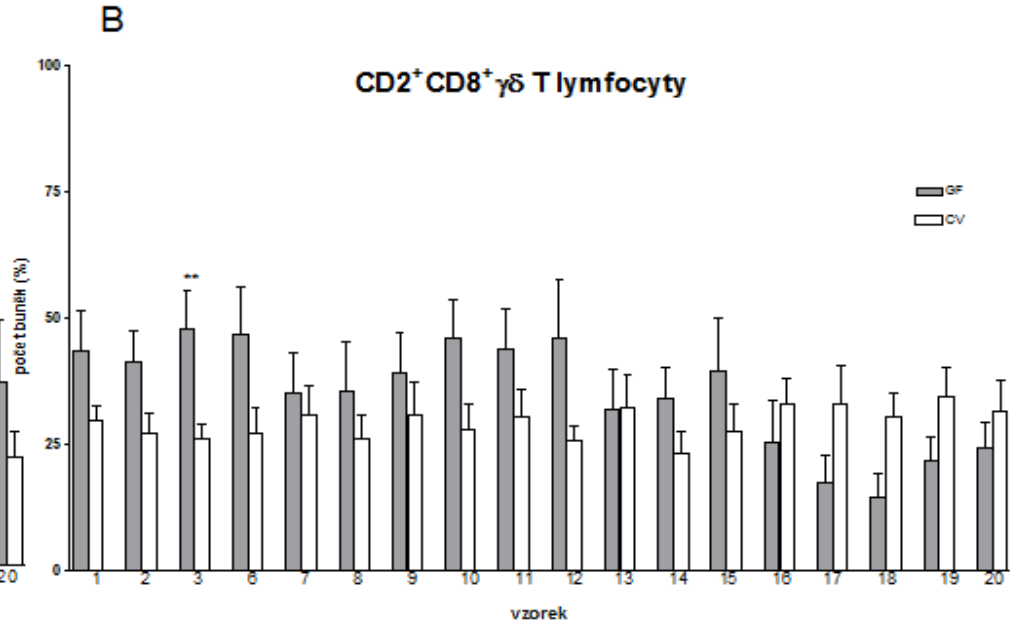
6.2.2.2 Distribuce γδ $CD2^{+}CD8^{+}$ T lymfocytů

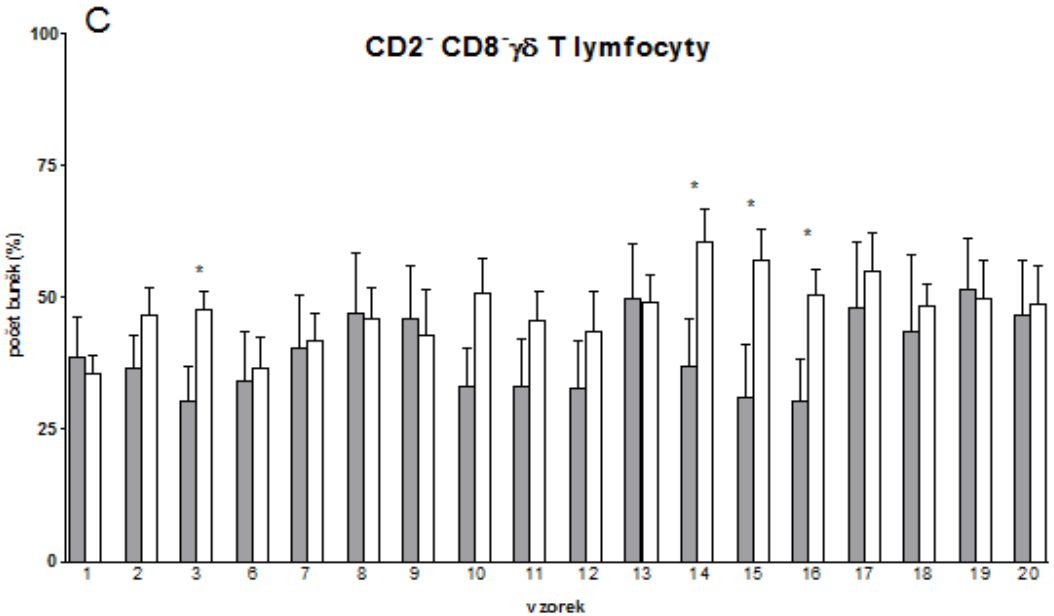
Procentuální zastoupení $CD2^{+}CD8^{+}$ γδ T lymfocytů (obr. 3B) vykazuje opačný trend než bylo popsáno pro $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocyty (obr. 3A). Na rozdíl od $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocytů, kde jediná statisticky významnou odlišnost mezi GF a CV selaty byla nalezena u vzorku č. 1 (obr. 4A), byla podobná odlišnost pro $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocyty nalezena u vzorku č. 3.

6.2.2.3 Distribuce γδ $CD2^{-}CD8^{-}$ T lymfocytů

Při vyhodnocování grafu zastoupení $CD2^{-}CD8^{-}$γδ T lymfocytů jsme zjistili, že u GF i CV selat je procentuální zastoupení těchto lymfocytů napříč střevem stejnoměrné a nevykazuje žádný trend. Při porovnání GF a CV selat však byly nalezeny místa střeva, kde byly rozdíli mezi těmito skupinami statisticky významné a to u vzorků 3 a 14-16. V těchto případech bylo zastoupení $CD2^{-}CD8^{-}$ γδ T lymfocytů vyšší u CV selat v porovnání s GF selaty (obr. 4C).







Obr. 4 - Distribuce populací lymfocytů ve střevu GF a CV selat.

Grafy znázorňují distribuci subpopulací γδ T lymfocytů napříč tenkým střevem u GF (šedé sloupce) a CV (bílé sloupce) selat pro (A) $CD2^{+}CD8^{-}$ T lymfocyty, (B) $CD2^{+}CD8^{+}$ T lymfocyty a (C) $CD2^{-}CD8^{-}$ T lymfocyty . Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé části střeva, kde 1 je úsek nejblíže tlustému střevu a 20 je vzorek nejblíže žaludku. Vzorky 4 a 5 nejsou zahrnuty, protože tyto části střeva byly použity pro jinou analýzu. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty.

6.2.3 Distribuce subpopulací B lymfocytů napříč tenkým střevem u GF a CV selat

6.2.3.1 Distribuce $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů

Většina $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů představuje naivní B lymfocyty a jedná se o nejpočetnější subpopulaci u mladých selat. To se potvrdilo i v naší analýze (obr. 5A) v které $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů také reprezentují nejpočetnější subpopulaci B lymfocytů tenkého střeva jak u GF, tak CV selat s přibližně shodným procentuálním zastoupením mezi 60-75%. Ačkoliv většina vzorků vykazovala vyšší zastoupení $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů u GF než CV selat, nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly, které by to potvrdily.

6.2.3.2 Distribuce $CD2^-CD21^+$ B lymfocytů

Zastoupení $CD2^-CD21^+$ B lymfocytů u GF selat je velmi nízké skrze celé střevo (obr. 5B). Jistý nárůst této subpopulace u GF selat lze pozorovat v oblasti terminálního ilea (vzorky 1-2), ale statisticky významná odlišnost od zbytku tenkého střeva nebyla prokázána. V případě CV selat je zastoupení studované subpopulace výrazně vyšší než u GF selat, čemuž odpovídá i množství statisticky významných odlišností mezi GF a CV selaty, které byly nalezeny (obr. 5B). $CD2^-CD21^+$ B lymfocyty jsou u CV selat, stehně jako u GF selat, výrazně více zastoupeny v oblasti terminálního ilea (obr. 5B, vzorky 1-3). Statistická analýza prokázala, že v rámci CV selat jde o významný rozdíl od zbytku tenkého střeva (obr. 5B, významnosti vyznačeny šipkami).

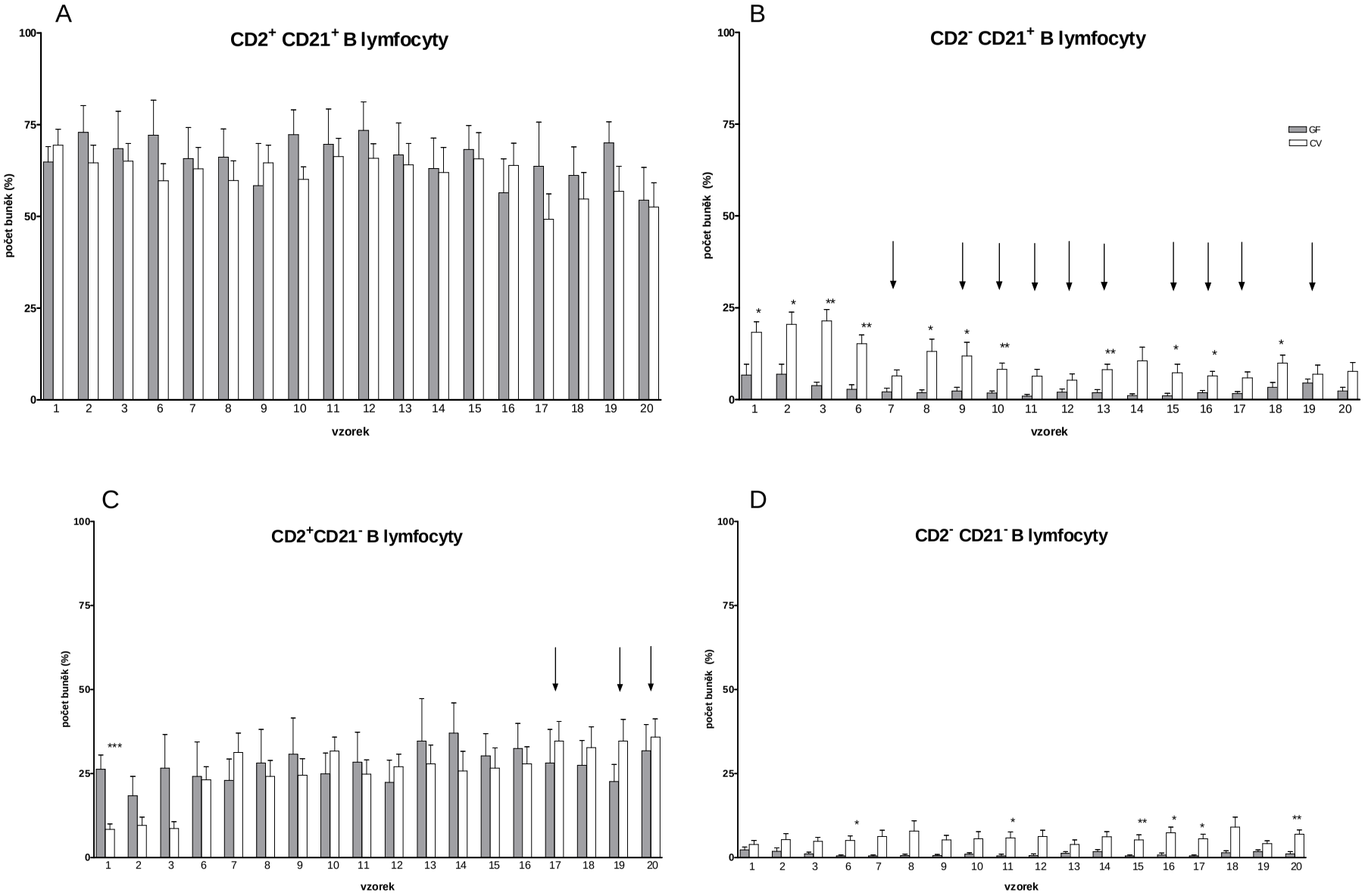
6.2.3.3 Distribuce $CD2^+CD21^-$ B lymfocytů

U GF selat jsme pozorovali rovnoměrné procentuální zastoupení této subpopulace napříč tenkým střevem, které se pohybuje v intervalu 20-30% (obr. 5C).

Z výsledků u CV selat jsme zjistili, že rozložení $CD2^+CD21^-$ B lymfocytů je též rovnoměrné, ale jejich zastoupení výrazně klesá v terminálním ileu (obr. 5C, vzorky 1-3). Výsledkem poklesu těchto B buněk u CV selat je i statisticky významná odlišnost od přední části tenkého střeva včetně duodena (obr. 5C, vzorky 17, 19, 20 – významnosti vyznačeny šipkami). Pokles $CD2^+CD21^-$ B lymfocytů v terminálním ileu (obr. 5C, vzorky 1-3) také způsobil statisticky významnou odlišnost mezi GF a CV selaty nalezenou na samém konci terminálního ilea (obr. 5C, vzorek 1).

6.2.3.4 Distribuce CD2⁻CD21⁻ B lymfocytů

CD2⁻CD21⁻ B lymfocyty jsou nejméně zastoupenou subpopulací B buněk v tenkém střevu u všech skupin selat (obr. 5D). U GF selat tato subpopulace téměř chybí a u CV selat jsme pozorovali jejich procentuální zastoupení v intervalu od 5-10%. Distribuce napříč střevem je jak u GF, tak u CV selat rovnoměrná (obr. 5D). Srovnání GF a CV selat prokázalo, že zastoupení CD2⁻CD21⁻ B lymfocytů je u mnoha vzorků tenkého střeva statisticky významně vyšší u CV selat než u GF selat (obr. 5D).


A
CD2+ CD21+ B lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek
B
CD2- CD21+ B lymfocyty
GF
CV
počet buněk (%)
vzorek
C
CD2+CD21- B lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek
D
CD2- CD21- B lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek

Obr. 5 *– Distribuce subpopulací B lymfocytů ve střevu u GF a CV selat*

Grafy znázorňují distribuci subpopulací B lymfocytů napříč tenkým střevem u GF (šedé sloupce) a CV (bílé sloupce) selat pro (A) CD2+CD21+ B lymfocyty, (B) CD2¯CD21+ B lymfocyty, (C) CD2+CD21¯ B lymfocyty a (D) CD2¯CD21¯ B lymfocyty. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé části střeva, kde 1 je úsek nejblíže tlustému střevu a 20 je vzorek nejblíže žaludku. Vzorky 4 a 5 nejsou zahrnuty, protože tyto části střeva byly použity pro jinou analýzu. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty. Statisticky významné odlišnosti teminálního ilea od ostatních částí tenkého střeva v rámci CV selat jsou vyznačeny šipkami.

6.3 POROVNÁNÍ DISTRIBUCE RŮZNÝCH POPULACÍ LYMFOCYTŮ V EPITELU A *LAMINA PROPRIA* STŘEVA

Cílem této kapitoly práce bylo zjistit rozdíly v procentuálním zastoupení základních populací lymfocytů a jejich subpopulací mezi střevním epitelem zastupovaným intraepiteliálními lymfocyty (IEL) a lymfocyty izolovanými z *lamina propria* (LPC). Druhým úkolem bylo zjistit zda přítomnost a zastoupení lymfocytů je a nebo není závislé na přítomnosti Payerských plátů. Pro tuto analýzu byly použity vzorky tenkého střeva č. 4 a 5, kdy jeden z nich izolovaný Payerský plát neobsahoval a druhý ho původně obsahoval, ale ten byl před přípravou buněk zcela odstraněn (viz. kapitola Materiál a Metody).

6.3.1 Závislost přítomnosti lymfocytů a jejich subpopulací na přítomnosti Payerského plátu

V rámci analýzy úseku tenkého střeva, který neobsahoval nebo původně obsahoval Payerské pláty jsme zjistili, že rozložení zkoumaných IEL a LPC (obr. 6) není významně ovlivněno blízkým umístěním Payerského plátu. Nebyly objeveny žádné statisticky významné rozdíly mezi vzorky s nebo bez Payerského plátu a to ani u GF, ani u CV selat. Analýza jednotlivých subpopulací lymfocytů potvrdila tyto nálezy. Protože se jedná o nevýznamné rozdíly, data jednotlivých subpopulací nejsou v této práci ukázána.

6.3.2 Distribuce αβ T lymfocytů

Množství αβ T lymfocytů v epitelu a *lamina propria* u GF selat je signifikantně odlišné (obr. 6A). *Lamina propria* obsahují αβ T lymfocyty ve významně vyšší míře. Podobný trend jsme v menší míře pozorovali u CV selat, ale signifikantní rozdíl nebyl prokázán (obr. 6A).

Porovnání GF a CV selat prokázalo, že procentuální zastoupení αβ T lymfocytů u IEL a LPC je srovnatelné (obr. 6A).

6.3.3 Distribuce γδ T lymfocytů

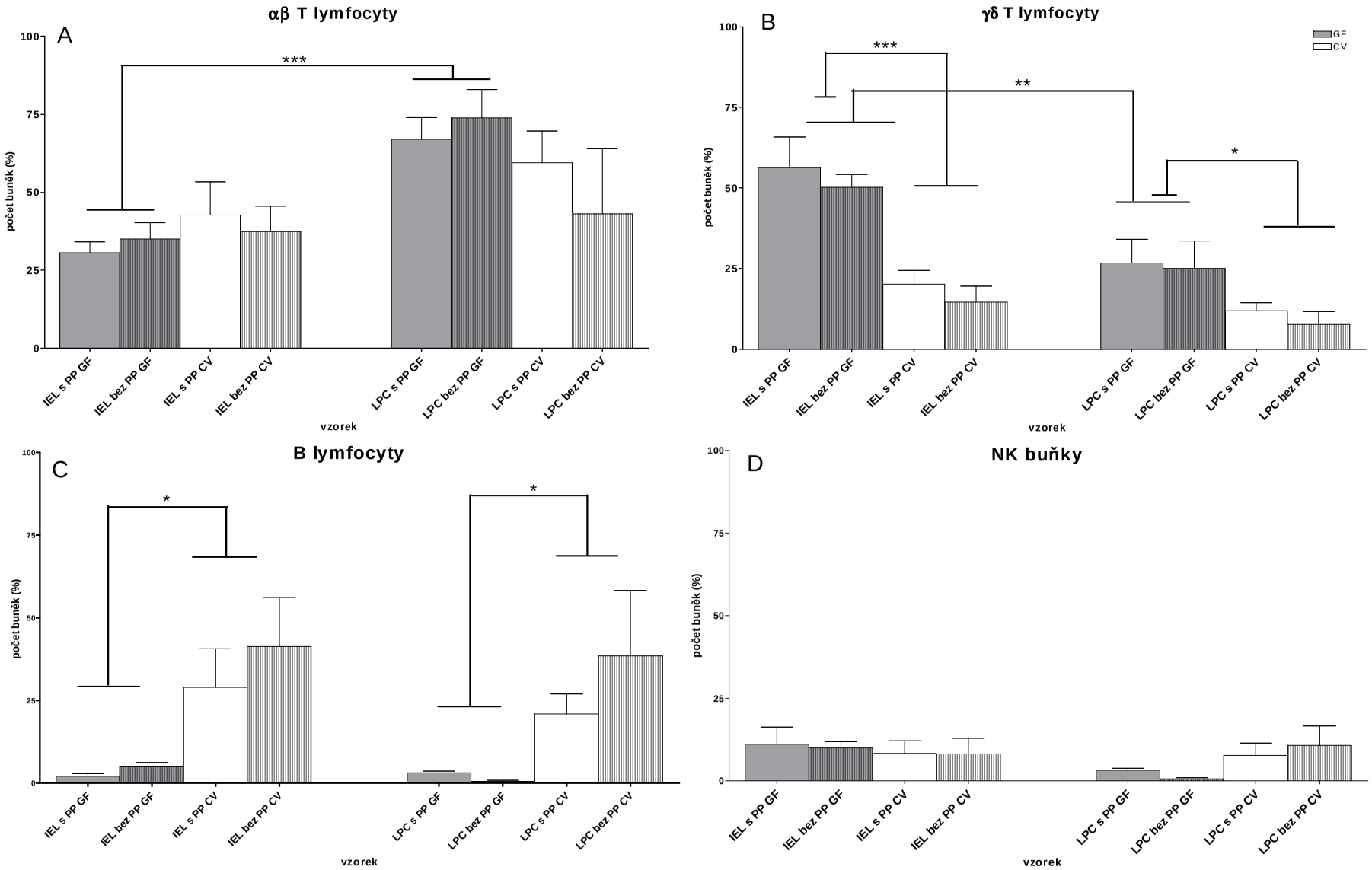
Jak v případě IEL, tak v případě LPC platí, že procentuální zastoupení γδ T lymfocytů je signifikantně vyšší u GF selat v porovnání s CV selaty (obr. 6B).
Zjistili jsme také, že γδ T lymfocyty se soustřeďují více v epitelu než v *lamina propria*, což bylo statisticky dokázáno pro GF selata. U CV selat statistická významnost prokázána nebyla (obr. 6B).

6.3.4 Distribuce B lymfocytů

U GF ani u CV selat jsme nezjistili rozdíl mezi zastoupením B lymfocytů v epitelu a *lamina propria* (obr. 6C). Je ale zřejmé, že u CV selat je B lymfocytů signifikantně více než v případě GF selat (obr. 6C).

6.3.5 Distribuce NK buněk

NK buněk ve studovaných částech střeva je malé množství a nezjistili jsme rozdíly v jejich procentuálním zastoupení při porovnání epitelu s *lamina propria* a ani při porovnání množství této populace mezi GF a CV selaty (obr. 6D).

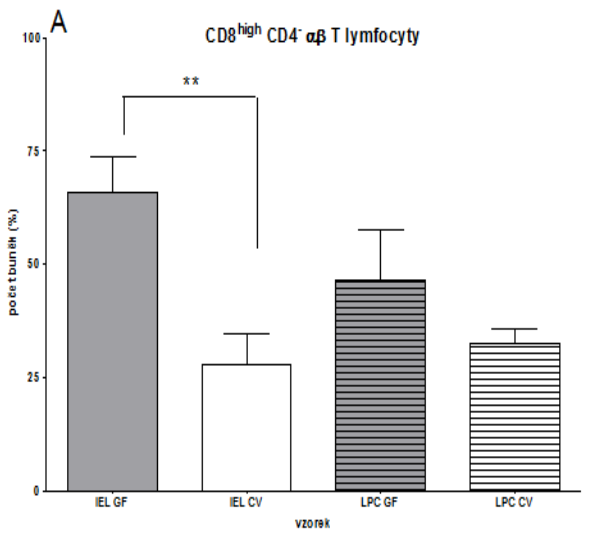

αβ T lymfocyty
A
***
počet buněk (%)
100
75
50
25
0
IEL s PP GF
IEL bez PP GF
IEL s PP CV
IEL bez PP CV
LPC s PP GF
LPC bez PP GF
LPC s PP CV
LPC bez PP CV
vzorek
γδ T lymfocyty
B
GF
CV
***
**
*
počet buněk (%)
vzorek
B lymfocyty
C
*
*
počet buněk (%)
vzorek
NK buňky
D
počet buněk (%)
vzorek

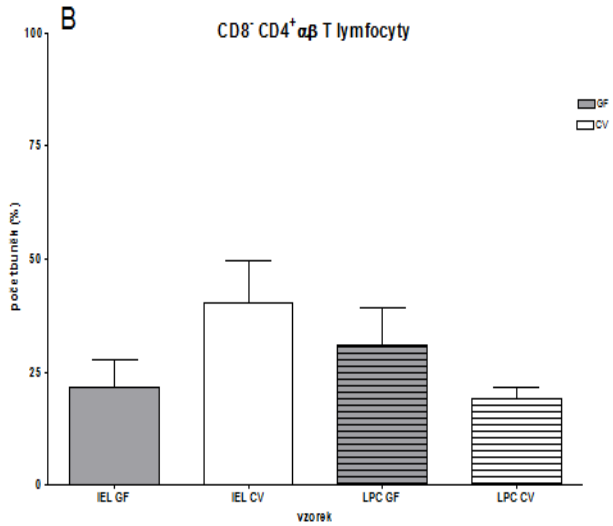
Obr. 6 – *Distribuce populací lymfocytů v epitelu a lamina propria střeva bezmikrobních a konvenčních selat*

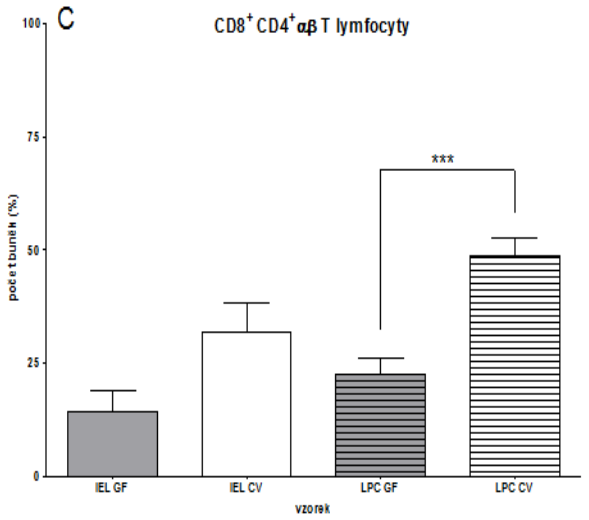
Grafy zobrazují zastoupení hlavních populací lymfocytů ((A) αβ T lymfocyty, (B) γδ T lymfocyty, (C) B lymfocyty, (D) NK buňky) v epitelu (IEL) a lamina propria (LPC) v částech tenkého střeva, které buď původně obsahovaly (s PP, sloupce bez vzoru) nebo neobsahovaly (bez PP, vodorovně pruhované sloupce) diskrétní Payerský plát. Šedé sloupce zobrazují údaje pro GF selata, zatímco bílé sloupce zobrazují data CV selat. Na ose x jsou vyznačeny zkoumané vzorky a na ose y je znázorněno procentuální zastoupení studovaných populací lymfocytů. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty.

6.4 POROVNÁNÍ DISTRIBUCE SUBPOPULACÍ ZÁKLADNÍCH TYPŮ LYMFOCYTŮ V EPITELU A *LAMINA PROPRIA*

6.4.1 Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů v rámci IEL a LPC







Obr. 7 - Distribuce subpopulací αβ T lymfocytů v epitelu a *lamina propria* tenkého střeva GF a CV selat

Grafy zobrazují zastoupení subpopulací (A) CD8^{high}CD4^{-} αβ T lymfocytů, (B) CD8^{-}CD4^{+} αβ T lymfocytů a (C) CD8^{+}CD4^{+} αβ T lymfocytů v epitelu a lamina propria v částech tenkého střeva, které buď neobsahovaly nebo původně obsahovaly JPP. Šedé sloupečky odpovídají údajům GF selat a bílé odpovídají CV selatům. Sloupečky bez vzoru jsou data buněk z epitelu a pruhované sloupečky odpovídají buňkám z *lamina propria.* Na ose x jsou vyznačeny zkoumané vzorky a na ose y je znázorněno prosentuální zastoupení studovaných subpopulací. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičkami jsou znázorněny statistické významnosti mezi GF a CV selaty.

6.4.1.1 Distribuce $CD8^{high}CD4^{-}$ αβ T lymfocytů v rámci IEL a LPC

Při studiu cytotoxických $CD8^{high}CD4^{-}$ αβ T lymfocytů jsme pozorovali, že je jejich zastoupení v epitelu statisticky signifikantně vyšší u GF selat v porovnání s CV selaty (obr. 7A). Mírně vyšší zastoupení této subpopulace αβ T lymfocytů u GF selat ve srovnání c CV selaty bylo pozorováno i v *lamina propria*, nicméně tento rozdíl není statisticky průkazný (obr. 7A).

Nebyl prokázán výrazný rozdíl v zastoupení cytotoxických αβ T lymfocytů při porovnání epitelu s *lamina propria* a to ani u GF, ani u CV selat (obr. 7A).

6.4.1.2 Distribuce $CD8^{-}CD4^{+}$ αβ T lymfocytů v rámci IEL a LPC

Další studovanou subpopulací jsou pomocné $CD8^{-}CD4^{+}$ αβ T lymfocyty u nichž jsme nezjistili významný rozdíl mezi IEL a LPC. Rozdíl nebyl pozorován ani při porovnání GF a CV selat (obr. 7B).

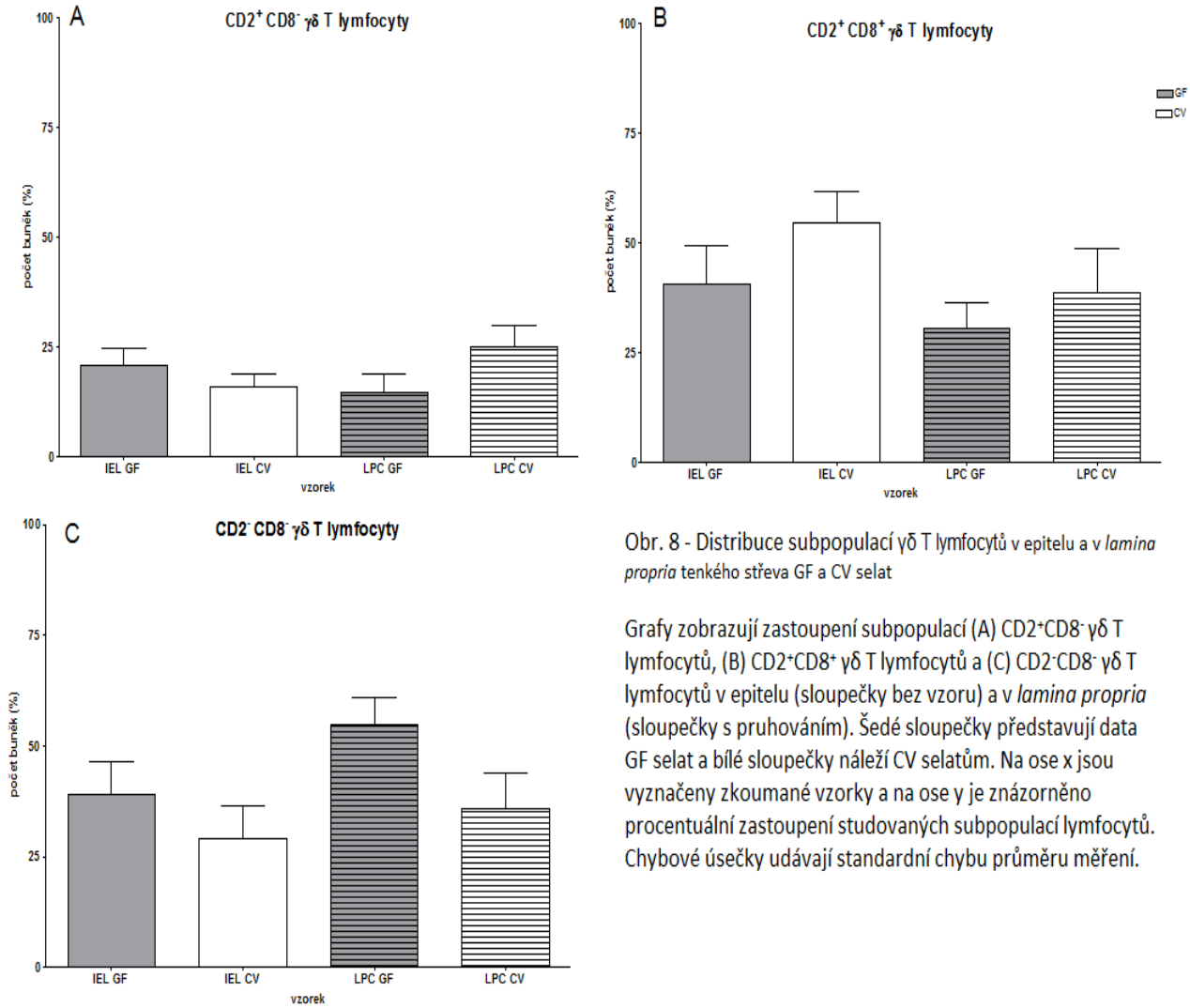
6.4.1.3 Distribuce $CD8^{+}CD4^{+}$ αβ T lymfocytů v rámci IEL a LPC

V případě efektorových/paměťových pomocných αβ T lymfocytů jsme v *lamina propria* pozorovali statisticky významně vyšší procentuální zastoupení těchto buněk u CV selat v porovnání s GF selaty (obr. 7C). Mírně vyšší zastoupení $CD8^{+}CD4^{+}$ αβ T lymfocytů je i v případě epitelu opět u CV selat, nicméně tento rozdíl není statisticky průkazný.

Nebyl prokázán výrazný rozdíl v zastoupení $CD8^{+}CD4^{+}$ αβ T lymfocytů při porovnání epitelu s *lamina propria* a to ani u GF, ani u CV selat (obr. 7C).

6.4.2 Distribuce subpopulací γδ T lymfocytů v epitelu a *lamina propria*

Z výsledků analýzy subpopulací γδ T lymfocytů jsme zjistili, že nejsou významné rozdíly v zastoupení mezi GF a CV selaty. Ani změny v zastoupení při porovnávání epitelu s *lamina propria* nejsou signifikantní (obr. 8A-C).



Obr. 8 - Distribuce subpopulací γδ T lymfocytů v epitelu a v *lamina propria* tenkého střeva GF a CV selat

Grafy zobrazují zastoupení subpopulací (A) CD2⁺CD8⁻ γδ T lymfocytů, (B) CD2⁺CD8⁺ γδ T lymfocytů a (C) CD2⁻CD8⁻ γδ T lymfocytů v epitelu (sloupečky bez vzoru) a v *lamina propria* (sloupečky s pruhováním). Šedé sloupečky představují data GF selat a bílé sloupečky náleží CV selatům. Na ose x jsou vyznačeny zkoumané vzorky a na ose y je znázorněno procentuální zastoupení studovaných subpopulací lymfocytů. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření.

6.4.3 Distribuce subpopulací B lymfocytů v epitelu a *lamina propria*

6.4.3.1 Distribuce $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů

V případě IEL pozorujeme signifikantně vyšší zastoupení $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů u CV selat ve srovnání s GF selaty (obr. 9A). Podobný trend lze vidět u buněk izolovaných z *lamina propria*, nicméně tento rozdíl není statisticky významný (obr. 9A).

Při srovnání zastoupení $CD2^+CD21^+$ B lymfocytů mezi epitelem a *lamina propria* v rámci GF selat a CV selat nebyly pozorovány rozdíly (obr. 9A).

6.4.3.2 Distribuce $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocytů

U subpopulace $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocytů můžeme dělat stejné závěry jako u $CD2^{+}CD21^{+}$ B lymfocytů s tím rozdílem, že v případě *lamina propria* byl statisticky podpořena i významnost při srovnání GF a CV selat (obr. 9B).

Stejně jako u $CD2^{+}CD21^{+}$ B lymfocytů není u $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocytů rozdíl mezi epitelem a *lamina propria* v rámci GF selat a CV selat (obr. 9B).

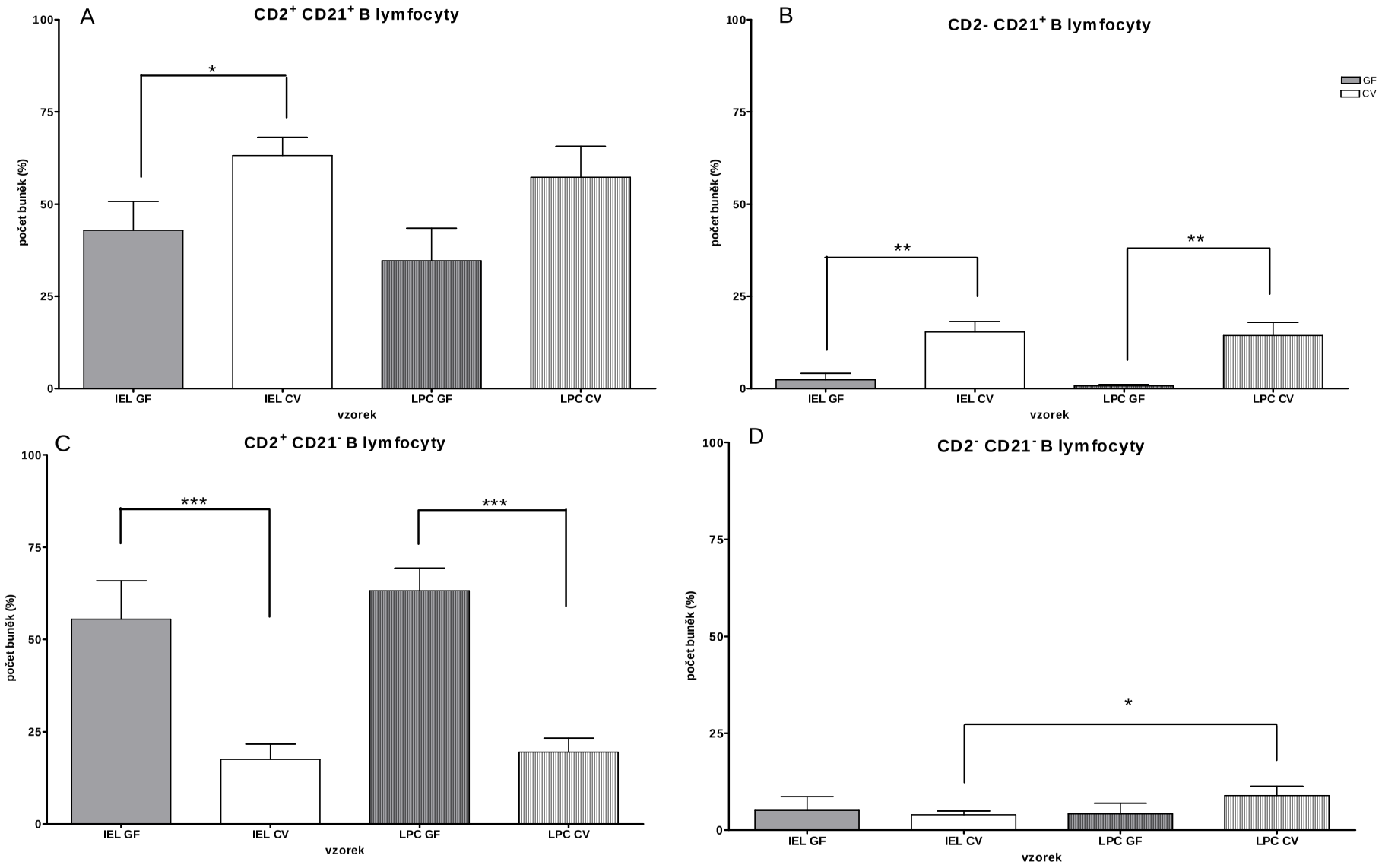
6.4.3.3 Distribuce $CD2^{+}CD21^{-}$ B lymfocytů

Subpopulace $CD2^{+}CD21^{-}$ B lymfocytů se chová doplňkově k $CD2^{+}CD21^{+}$ a $CD2^{-}CD21^{+}$ subpopulacím a proto jak u IEL tak LPC pozorujeme signifikantně nižší zastoupení $CD2^{+}CD21^{-}$B lymfocytů u CV selat ve srovnání s GF selaty (obr. 9C).

Stejně jako u $CD2^{+}CD21^{+}$ a $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocytů není u $CD2^{+}CD21^{-}$ B lymfocytů rozdíl mezi epitelem a *lamina propria* v rámci GF selat a CV selat (obr. 9C).

6.4.3.4 Distribuce $CD2^{-}CD21^{-}$ B lymfocytů

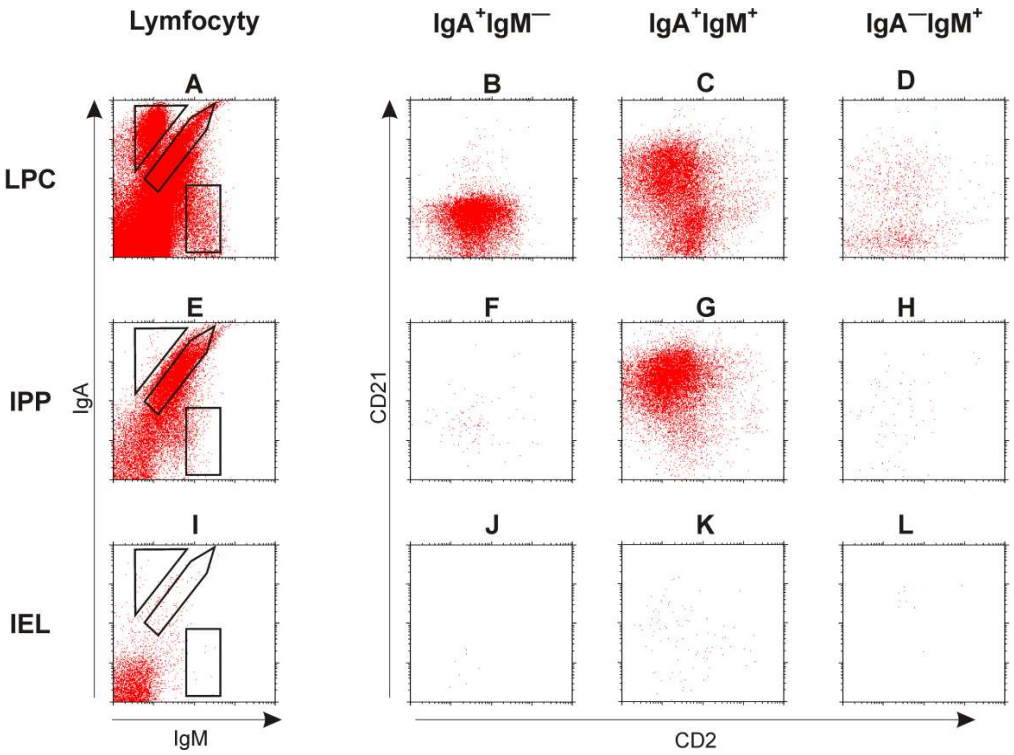
Při studiu konečných stádií vývoje B lymfocytů jsme pozorovali signifikantní rozdíl v jejich distribuci při porovnání epitelu a *lamina propria* v případě CV selat (obr 9D). Všechna ostatní srovnání neprokázala statistickou významnost.


A
CD2+ CD21+ B lymfocyty
B
CD2- CD21+ B lymfocyty
C
CD2+ CD21- B lymfocyty
D
CD2- CD21- B lymfocyty
počet buněk (%)
vzorek
IEL GF
IEL CV
LPC GF
LPC CV
GF
CV
0
25
50
75
100
*
**
***

Obr. 9 - *Distribuce subpopulací B lymfocytů v epitelu a lamina propria GF a CV selat*

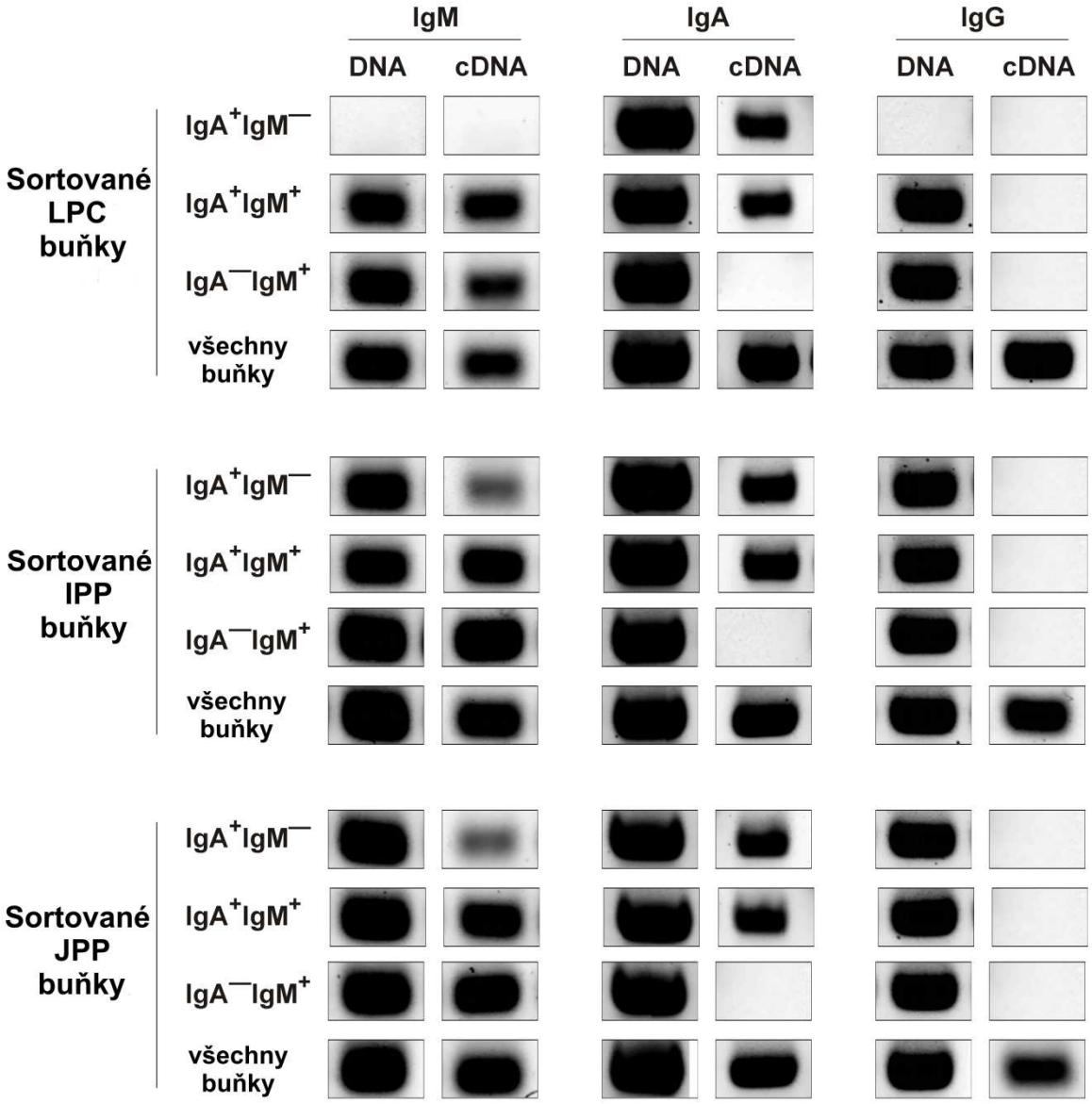
Grafy zobrazují zastoupení subpopulací B lymfocytů ((A) $CD2^{+}CD21^{+}$ B lymfocyty, (B) $CD2^{-}CD21^{+}$ B lymfocyty, (C) $CD2^{+}CD21^{-}$ B lymfocyty, (D) $CD2^{-}CD21^{-}$ B lymfocyty) v epitelu (sloupce bez vzoru) a lamina propria (sloupce s pruhováním). Šedé sloupečky zobrazují údaje GF selat, bílé zobrazují data CV selat. Na ose x jsou vyznačeny zkoumané vzorky a na ose y je znázorněno procentuální zastoupení studovaných populací lymfocytů. Chybové úsečky udávají standardní chybu průměru měření a hvězdičky znázorňují míru statistické významnosti měřené mezi CV a GF selaty.

6.5 Analýza stavu genového přeskupení sortovaných B lymfocytů



Obr. 10 *– Demonstrační obrázek analýzy povrchového fenotypu lymfocytů GALT s ohledem na expresi IgA/IgM a CD2/CD21 u B buněk.*

Lymfocyty izolované z lamina propria (LPC), ileálních Payerských plátů (IPP) a epitelu (IEL) byly povrchově označeny pro IgA a IgM expresi a analyzovány pomocí průtokové cytometrie (levý sloupec, dotploty A,E,I). Jednotlivé IgA/IgM subpopulace B buněk byly ohraničeny pomocí regionů a CD2/CD21 fenotyp těchto subpopulací B buněk je znázorněn v pravé části obrázku.



Obr. 11 – *Stav DNA přeskupení a transkriptů pro IgM, IgA a IgG u sortovaných B buněk izolovaných z různých části GALT*

Na základě IgM/IgA fenotypu byly lymfocyty izolované z lamina propria (LPC, horní blok) a ileálních (IPP, prostřední blok) nebo jeunálních Payerských plátů (JPP, dolní blok) sortovány pomocí průtokové cytometrie do tří nezávislých subpopulací B buněk:IgA^{+}IgM^{-}, IgA^{+}IgM^{+} a IgA^{-}IgM^{+}. Stejný počet buněk z původní nesortované suspenze (všechny buňky) sloužil jako pozitivní kontrola. Po izolaci RNA a DNA a přípravě cDNA byly jednotlivé vzorky podrobeny PCR analýze na přítomnost částí IgM, IgA a IgG (popisky zcela nahoře) a to na úrovni DNA (genom) i cDNA (transkripty).

6.5.1 Exprese IgM a IgA u B lymfocytů izolovaných z *lamina propria*, Payerských plátů a epitelu

Fenotypizace lymfocytů izolovaných z *lamina propria* , Payerských plátů a epitelu (obr. 10) prokázala, že zatímco ve směsi LPC se běžně vyskytují B lymfocyty s fenotypem $IgA^{+}IgM^{-}$ (obr. 10A), tyto B lymfocyty prakticky chybí u IPP (obr. 10E) nebo IEL (obr. 10I). Zajímavý je výskyt B lymfocytů, které na svém povrchu nesou jak IgA, tak IgM a tyto buňky jsou velmi početné jak v LPC (obr., 10A), tak IPP (obr. 10E). B lymfocyty s fenotypem $IgA^{-}IgM^{+}$ jsou ve všech studovaných tkáních vzácné. Zajímavá je též skutečnost, že u IEL je všeobecně poměrně malé množství B buněk (obr. 10I).

Analýza CD2/CD21 fenotypu u jednotlivých IgA/IgM subpopulací B lymfocytů prokázala, že $IgA^{+}IgM^{-}$ jsou výhradně $CD21^{-}$ (obr. 10B), zatímco $IgA^{+}IgM^{+}$ jsou převážně $CD21^{+}$ (obr. 10C a 10G).

6.5.2 Stav genomového přeskupení a přepisovaných transkriptů pro jednotlivé imunoglobulinové třídy u sortovaných B buněk

Na základě zjištěného IgA/IgM fenotypu B buněk, jak je ukázáno na obrázku 10, bylo provedeno sortování čistých subpopulací B buněk pro následnou molekulární analýzu (obr. 11). Do sortování byly zahrnuty pouze buňky izolované z *lamina propria* a Payerských plátů, protože jsme nebyli schopni izolovat dostatečný počet buněk epitelu pro sortování a také protože frekvence B buněk pozitivních pro IgA anebo IgM je v epitelu velmi nízká.

Z PCR analýzy genomového stavu (DNA analýza) přeskupení pro IgM, IgA a IgG je zřejmé, že zatímco $IgA^{+}IgM^{-}$ B lymfocyty sortované z LPC nemají na úrovni DNA přítomnou část studovaného genu pro IgM a IgG, stejné B buňky sortované z ileálních nebo jejunálních Payerských plátů tyto úseky mají v zárodečné konfiguraci. Naopak, všechny $IgA^{+}IgM^{+}$ i $IgA^{-}IgM^{+}$ B lymfocyty sortované z jakéhokoliv zdroje mají úseky DNA pro IgM, IgA a IgG v zárodečné konfiguraci.

Z analýzy přítomnosti transkriptů (cDNA analýza) pro IgM, IgA a IgG je zřejmé, že povrchový fenotyp buněk odpovídá stavu transkriptů v těchto buňkách. Jedinou výjimkou jsou $IgA^{+}IgM^{-}$ B buňky vysortované z Payerských plátů, které vykazují slabou přítomnost transkriptů pro IgM ačkoliv IgM molekulu nenesou na svém povrchu.

7 DISKUZE

Z výsledků této práce vyplývá významný rozdíl mezi GF a CV selaty. Rozdíly jsou pozorovatelné v procentuálním zastoupení všech základních lymfocytárních populací, kterými jsou αβ T lymfocyty, γδ T lymfocyty, B lymfocyty i NK buňky. Takové výsledky naznačují, že kolonizace střeva je významným faktorem, který ovlivňuje zastoupení jednotlivých populací lymfocytů v tenkém střevu selete. Po kolonizaci dochází k výraznému nárůstu počtu B lymfocytů na úkor zbytku populací lymfocytů. To potvrzuje dřívější práce, které ukázaly, že kolonizace střeva má mitogenní účinek na B lymfocyty a sekreci imunoglobulinů, což se projevuje jak lepší odpovídavostí CV selat na T-závislé i T-nezávislé antigeny, tak vyšší koncentrací protilátek v krvi (Butler a spol., 2002). Naopak u nekolonizovaných GF selat jsme dokázali daleko větší množství αβ T lymfocytů a γδ T lymfocytů na úkor B lymfocytů. Takové nálezy jsou také v souladu s výsledky pozorovanými v jiných laboratořích (Pabst a Rothkötter, 1999), i když závěry této práce jsou omezeny pouze na IPP. Obecně by naše nálezy mohly naznačovat, že z hlediska adaptivní imunity je obranyschopnost v tenkém střevu CV selat z větší části zajišťována B než T lymfocyty. Alternativní vysvětlením může být skutečnost, že na zajištění fungování správné adaptivní imunity u CV selat je ve střevu zapotřebí proporcionálně méně T než B lymfocytů. V každém případě však naše výsledky silně zpochybňují teorii, že IPP jsou primární lymfatický orgán a mají stejnou funkci jako Fabriciova bursa u ptáků (Reynolds a Morris, 1983). V takovém případě by se distribuce B lymfocytů v oblastech výskytu IPP měla zcela zásadně lišit od zbytku tenkého střeva. Naopak, výsledky této práce podporují nálezy, v kterých chirurgické odstranění oblasti s IPP prokázalo, že IPP nejsou nezbytně nutné pro tvorbu a udržení B lymfocytů a že vývoj B lymfocytů v IPP je závislý na přítomnosti antigenů (Šinkora a spol., 2011).

B lymfocyty vykazují po kolonizaci střeva podstatný nárůst ve svém množsví v celé délce střeva a ve všech komponentách GALT, včetně epitelu a *lamina propria*. Analýza subpopulací B buněk prokázala nárůst především v četnosti $CD2^{-}CD21^{+}$ a $CD2^{-}CD21^{-}$ B buněk. Subpopulace B lymfocytů s fenotypem $CD2^{-}CD21^{+}$ představuje aktivovaná stádia B buněk, subpopulace $CD2^{-}CD21^{-}$ je tvořena především koncovými vývojovými stádii, které produkují protilátky (Šinkora a Butler, 2009). Zvýšený výskyt těchto dvou subpopulací B buněk je proto zcela v souladu s představou, že po kolonizaci tenkého střeva dochází k aktivaci B buněk a jejich následné diferenciaci. Důležitý je nález, že frekvence

aktivovaných stádií B buněk u CV selat je signifikatně vyšší v oblastech ilea (vzorky 1-3) než ve většině ostatních částí tenkého střeva. Naopak, u GF selat nelze v oblasti ilea pozorovat žádné rozdíly oproti zbytku tenkého střeva. Takové nálezy vyvrací teorii, že v oblasti terminálního ilea a místa výskytu IPP dochází k primárnímu vývoji B buněk nezávisle na přítomnosti antigenu (Reynolds a Morris, 1983, Reynolds et Morris, 1984, Yasuda a spol., 2006). Naopak, zvýšený výskyt aktivovaných stádií B buněk naznačuje přímý vliv antigenu na vývoj terminálního ilea. Nejpravděpodobnějším vysvětlením těchto změn je anatomická poloha ilea, které přímo sousedí s tlustým střevem. Bylo prokázáno, že ileum je kolonizováno mnohem vyšším počtem mikroorganismů než jejunum (Hao a Lee, 2004). K nárůstu četnosti aktivovaných stádií B lymfocytů dochází i v obou studovaných součástech stěny tenkého střeva, tedy v epitelu i v *lamina propria*, a to na úkor dalších subpopulací B lymfocytů. Z tohoto hlediska je důležité podotknout, že B lymfocyty před kolonizací v těchto tkáních prakticky chybí. To v konečném důsledku může znamenat, že zvýšení aktivovaných stádií B buněk u IEL a LPC po kolonizaci narůstá mnohonásobně. Studium epitelu a *lamina propria* však také odhalilo, že frekvence $CD2^{-}CD21^{-}$ B buněk produkujících protilátky se vlivem kolonizace nezvyšuje. Ačkoliv v současnosti nemáme žádná experimentální data, která by vysvětlovala tuto stagnaci, vysvětlujeme si tento nález možnou migrací B lymfocytů do krve a dalších periférních lymfoidních tkání. To by vysvětlovalo, proč jsou tyto stádia B buněk po kolonizaci v krvi a sekundárních lymfatických orgánech běžná (Šinkora a spol., 1998a, Šinkora a Butler, 2009).

T lymfocyty se obecně chovají v obráceném poměru k B lymfocytům a jejich frekvence po kolonizaci střeva klesá v přímém poměru k zvyšující se četnosti B buněk. Tyto nálezy jsou plně v souladu s předchozí prací týmu laboratoře (Šinkora a spol., 2011). Závěr, že dochází k nárůstu počtu B buněk a ne k poklesu T lymfocytů je založen na dříve provedených histologických studiích, které jasně dokazují nárůst B lymfocytů po kolonizaci střeva (Rothkotter a Pabst, 1989, Pabst a Rothkötter, 1999, Leiebler-Tenorio a Pabst, 2006). Tomuto závěru odpovídá i skutečnost, že u αβ i γδ T lymfocytů nedochází po kolonizaci k žádným signifikantním změnám v rámci jejich subpopulací. Zdá se, že T lymfocyty jsou distribuovány skrze střevo rovnoměrně a neměnně. Nicméně, v rámci studia IEL a LPC byly odhaleny rozdíly. U αβ T lymfocytů jsme zjistili, že se v *lamina propria* vyskytuje daleko větší množství této populace lymfocytů než v epitelu, přičemž γδ T lymfocyty vykazují opačný trend. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky kolektivu Vega – Lópeze, kteří v *lamina propria* pozorovali převahu $CD4^{+}$ lymfocytů, zároveň

pozorovali převahu $CD2^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ lymfocytů v epitelu (Vega – López a spol., 2001). Lymfocyty, které definovali jako $CD4^{+}$ představují převážně αβ T lymfocyty a $CD2^{+}CD4^{-}$ $CD8^{-}$ lymfocyty mohou být buď B lymfocyty nebo $CD2^{+}CD8^{-}$ γδ T lymfocyty. Přínosem této práce je schopnost mnohem lépe rozlišit jednotlivé subpopulace T lymfocytů. Na základě výsledků lze konstatovat, že kolonizace má u LPC i IEL zřejmý vliv na nárůst pomocných a pokles cytotoxických αβ T lymfocytů. U lamina propria je tento efekt signifikantně zřejmý pro efektorové/paměťové $CD8^{+}CD4^{+}$, v epitelu pro cytotoxické $CD8^{+}CD4^{-}$ αβ T lymfocyty. Zřejmý nárůst výskytu efektorových/paměťových stádií αβ T lymfocytů po kolonizaci je logický a souhlasí s dřívějšími nálezy (Rothkötter a spol., 1994).

Analýza γδ T lymfocytů byla provedena s cílem zjistit případné rozdíly v distribuci jejich CD2/CD8 subpopulací. V současnosti jsou $CD2^{-}CD8^{-}$ γδ T lymfocyty považovány za více naivní, naopak se spekuluje, že $CD2^{+}CD8^{+}$ γδ T lymfocyty jsou efektorové buňky (Štěpánová, 2011, Šinkora a Butler, 2009). Studium subpopulací γδ T lymfocytů však neprokázalo žádné nerovnoměrnosti v jejich distribuci skrze tenké střevo selat u obou experimentálních skupin. Jedinou výjimkou jsou ojedinělé případy statistické signifikance, které jsou pro jednotlivé subpopulace vždy lokalizovány do jediného úseku tenkého střeva, který se však vždy liší svou polohou. U $CD2^{-}CD8^{-}$ γδ T lymfocytů jsme našli oblast předního jejuna (vzorky 14-16), které vykazují statisticky signifikatní rozdíl mezi GF a CV selaty, nicméně v současnosti nemáme žádné přijatelné vysvětlení pro tento nález. Doufáme, že následující studie v oblasti γδ T buněk pomohou odhalit další funkce CD2/CD8 subpopulací a pomohou vysvětlit naše současné výsledky.

Jedním z nejdůležitějších cílů diplomové práce bylo zjistit IgM/IgA fenotyp přítomných B buněk v jednotlivých komportmentech GALT a případný stav izotypového přesmyku protilátkových tříd po sortování čistých subpopulací. Výsledky jasně prokázaly, že Payerské pláty, *lamina propria* ani epitel neobsahují výrazné množství naivních $IgM^{+}IgA^{-}$ B buněk. Takové nálezy jsou v přímém rozporu s myšlenkou, že v určitých oblastech tenkého střeva dochází k rozrůzněním protilátek na úrovni IgM podobným způsobem, jak bylo popsáno u ptáků a Fabriciovy bursy (Ratcliffe, 2006). Naopak, Payerské pláty i *lamina propria* obsahují izotypově přesmyknuté B buňky, které na svém povrchu nesou BCR s dvojím typem C_H řetězce: $IgA^{+}IgM^{+}$. V obou typech tkání bylo molekulární analýzou prokázáno, že tyto dvojitě-pozitivní B buňky mají zachovanou zárodečnou konfigurací C_H genů a proto používají pro změnu izotypu alternativní sestřih

(Hardy a Hayakawa 2001). To zřejmě platí i pro B lymfocyty s $IgA^{+}IgM^{-}$ fenotypem, které se vyskytují v ileálních i jejunálních Payerských plátech. Tyto buňky s největší pravděpodobností omezují alternativní sestřih ve prospěch IgM, o čemž svědčí jednak nízká úroveň transkriptu, ale také ztráta IgM z povrchu. Významná je skutečnost, že tyto buňky jsou v Payerských plátech velmi vzácné a nedochází k jejich akumulaci. Na druhou stranu fenotypem stejné $IgA^{+}IgM^{-}$ B lymfocyty v *lamina propria* prošly genovým přeskupením a postrádájí Cμ a Cγ úseky. Tyto $IgA^{+}IgM^{-}$ B buňky se v rámci LPC akumulují a tvoří významnou populaci B buněk specializujících se na produkci IgA. To je ostatně i v souladu s předchozími pracemi, které prokázaly důležitou roli IgA^{+} B buněk v *lamina propria* (Allen a Porter, 1977). Tyto nálezy spolu s předchozími výsledky (Šinkora a spol., 2011) nás vedou k přesvědčení, že izotypový přesmyk je započat v obou typech Payerských plátů (IPP i JPP) alternativním sestřihem, přičemž sestřih pro IgM je postupně znevýhodňován. Takové B lymfocyty produkují IgA ve větší míře než IgM, což by mohlo představovat tlak na buňku, aby začala s procesem přeskupení C_H segmentů. V tomto stádiu opouští B lymfocyt Payerské pláty a přesouvá se do efektorových míst střeva, které jsou převážně v *lamina propria*. Během přesunu pravděpodobně dochází k rekombinaci C_H úseků. Konečná stádia $IgA^{+}IgM^{-}$ buněk v *lamina propria* se hromadí a produkují IgA. Místo a způsob, jakým ve skutečnosti dochází k izotypovému přesmyku na IgA^{+} buňky však bude pravděpodobně složitější. Nedávná studie Fritze a spol. (Fritz a spol., 2011) ukázala, že u myší dochází k přesmyku v Payerských plátech a v izolovaných lymfoidních folikulech v *lamina propria* a že pro tento děj má zásadní význam přítomnost oxidu dusnatého (NO) jehož přítomnost je regulována inducibilní syntázou oxidu dusnatého (iNOS). Velmi zajímavým výsledkem této práce je i nález, že NO je produkován samotnými přesmyknutými IgA^{+} B lymfocyty. Oxid dusnatý však nebyl produkovaný všemi IgA^{+} B lymfocyty, což naznačuje míru regulace i možnou nezávislost na NO. Zároveň však v této práci byla dokázána úloha kolonizace tenkého střeva, jelikož nebyla dokázána produkce NO u GF myší (Fritz a spol., 2011).

8 ZÁVĚR

Výsledky této práce souhrně naznačují, že kolonizace střeva má zásadní vliv na vývoj všech základních populací lymfocytů i některých jejich subpopulací. Největší vliv kolonizace byl pozorován u B lymfocytů a jejich subpopulací. Na druhou stranu nebylo prokázáno, že distribuce lymfocytů v určitých oblastech tenkého střeva se zcela zásadně liší od jiných oblastí tenkého střeva. I když za místo určitých změn lze považovat oblast terminálního ilea, jsou tyto změny způsobeny nejspíše díky vysoké pravděpodobnosti styku lymfocytů s bakteriálním obsahem tlustého střeva. Takové výsledky jsou v rozporu s názorem, že prasata využívají určité části tenkého střeva k tvorbě primárního B buněčného repertoáru, který je nezávislý na výskytu antigenu a připomíná primární lymfopoetickou aktivitu ptačí Fabriciovy bursy. Výsledky také naznačují, že v *lamina propria* se vyskytují spíše αβ T lymfocyty zatímco v epitelu je větší zastoupení γδ T lymfocytů. V souladu s obecnými nálezy se B lymfocyty v těchto kompenentách GALT objevují až po kolonizaci. Analýza genomu a transkriptů B buněk pro jednotlivé imunoglobulinové třídy naznačila, že zatímco v Payerských plátech dochází k změně izotypu protilátek na úrovni alternativního sestřihu, v *lamina propria* se tomu děje na úrovni sekundárního přeskupení.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Allen W. D., Porter P., 1977. The relative frequecies and distribution of immunoglobulin – bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology* 32(5):819-824

Allman D., Srivastava B., Lindsley R. C., 2004. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunol Rev*. 197:147-160

Alt F. W., Yancopoulos G. D., Blackwell T.K., Wood C., Thomas E., Boss M., Coffman R., Rosenberg N., Tonegawa S., Baltimore D. 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J*. 3(6): 1209–1219

Azulay-Debby H., Melamed D., 2007. B cell receptor editing in tolerance and autoimmuity. *Front Biosci*. 12:2136-47

Berek C., Berger A., Apel M., 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 67(6):1121-1129

Butler J. E., Sun J., Navarro P., 1996. The swine immunoglobulin heavy chain locus has a single JH and no identifiable IgD. *Int. Immunol*. 8(12):1897-1904

Butler J. E., 1997. Immunoglobulin gene organization and the mechanism of repertoire development. *Scand J Immunol*. 45(5):455-462

Butler J. E., Weber P., Sinkora M., Baker D., Schoenderr A, Mayer B., Francis D., 2002. Antibody Reperoire Development in Fetal and Neonatal Piglets. VIII. Colonization Is Required for Newborn Piglets to Make Serum Antibodies to T – Dependent and Type 2 T – Independent Antigens. *J Immunol* 169:6822-6830

Butler J. E., Sinkora M., Wertz N., Holtmeier W., Lemke C. D., 2006. Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet. Res*. 37:417-441

Butler J., E. a spol., 2012. Antibody Repertoire Develpoment in Fetal and Neonatal Piglets. XX. B Cell Lymphogenesis Is Absent in the Ileal Peyer´s Patches, Their Repertoire Development Is Antigen Dependent, and They Are Not Required for B Cell Maintenance. *The Journal of Immunology* 10: 5141-5149

Croitoru K., Bienenstock J., 1994. Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue. *Handbook of Mucosal Immunology*. 141-149. San Diego, Academic Press

Davis M. M., Bjorkman P. J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 335(6192):744

Denyer M. S., Wileman T. E., Stirling C. M. Zuber B., Takamatsu H. H., 2006. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxicT, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 110:279-292

Durandy A., 2003. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur. J. Immunol*. 33: 2069–2073

Edry E., Melamed D., 2004. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol*. 173(7):4265-4271

Eguchi-Ogawa T., Wertz N. Sun X. Z., Puimi F., Uenishi H., Wells K., Chardon P., Tobin G. J., Butler J. E., 2010. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XI. The relationship if variable heavy chain gene usage and the genomic organization of the variable heavy chain locus. *J Immunol*. 184(7): 3734-3742

Ehlich A., Schaal S., Gu H., Kitamura D., Müller W., Rajewsky K., 1993. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell*. 72(5):695-704

Ekman A., Pessa-Morikawa T., Liljavirta J., Niku M., Iivanainen A., 2010. B-cell development in bovine fetuses proceeds via a pre-B like cell in bone marrow and lymph nodes. *Dev Comp Immunol*. 34(8):896-903

Fagarasan S., Honjo T., 2004. Regulation of IgA sythesis at mucosal sufaces. *Curr Opin Immunol.* 16(3):277-283

Fritz J. H., Rojas O. L., Simard N., McCarthy D. D., Hapfelmeier S., Rubino S., Robertson S. J., Larijani M., Grosselin J., Ivanov I. I., Martin A., Casellas R., Philpott D. J., Girardin S. E., McCoy K. D., Macpherson A. J., Paige C. J., Gommerman J. L., 2011. Acquisition of a multifuntional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481(7380):199-203

Gerber H. A., Morris B., Trevella W., 1986. The role of gut-associated lymphoid tissues in the generation of immunoglobulin-bearing lymphocytes in sheep. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 64(Pt 3): 201-213

Gerner W., Käser T., Saalmüller A., 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells – An update. *Developmental and Comparative Immunology.* 33:310-320

Ghia P., Boekel E., Sanz E., de la Hera A., Rolink A., Melchers F., 1996. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp. Med*. 184(6):2217-2229

Glick B., Chang T. S., Jaap R. G. A. 1956. The Bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl. *Poult Sci*. 35: 224-225

Hao W. L., Lee Y. K., 2004. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol. Biol.* 268:491-502

Hardy R. R., Li Y. S., Allman D., Asano M., Gui M., Hayakawa K., 2000. B-cell commitment, development and selection. *Immunol Rev*. 175:23-32

Hardy R. R., Hayakawa K., 2001. B cell development pathways. *Ann. Rev. Immunol*. 19:595-621

Hayday A., C., 2000. γδ T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 18:975-1026

Hořejší V., Bartůňková J. 2009. Základy imunologie. 4th ed. Praha: Triton

Huh N. D., Kim Y. B., Koren H. S., Amos D. B, 1981. Natural killing and antibody – dependent cellular cytotoxicity in specific-pathogen-free miniature swine and germ-free piglets. II. Ontogenic development of NK and ADCC. *Int J Cancer* 28(2):175-178

Janeway Ch. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., 2001. Immunobiology 5th edition. *New York and London: Garland Science*

Jenne C. N., Kennedy L. J., McCullagh P., Reynolds J. D., 2003. A new model of sheep Ig diversification: shifting the emphasis toward combinatorial mechanisms and away from hypermutation. *J Immunol*. 170(7): 3739-3750

Kaleczyc J., Podlasz P., Winnicka A., Wasowicz W., Sienkiewicz W., Zmudzki J., Lakomy M., 2010. Characterozation od Autonomic Nerve Markers and Lymphocyte Subsets in the Ileal Peyer´s Patch of Pigs Infected Experimentally with Brachyspira hyodysenteriae. *J Comp. Path*. 143(4):248-257

Koopman J. P., Mullink J. A. M. A., Prins R. A., Welling G. W., Hectors M. C., 1982. Association of germfree mice with intestinal microflora obtained from „normal“ mice. *Lab Animal* 16,59

Lanning D., Zhu X., Zhai S. K., Knight K. L., 2000. Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol Rev*. 175:214-228

Lee J., Choi K., Olin M. R., Cho S. N., Molitor T. W., 2004. gd T cells in immunity induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette – Guerin vaccination. *Infect Immun*.72(3):1504-1511

Leiebler – Tenorio E. M., Pabst. R., 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37:257-280

Mage R. G., Lanning D., Knight K. L., 2006. B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol*. 30(1-2): 137-153

Maul R. W., Geathart P. J., 2010. AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol*. 105: 159-191

Mazzoni M., Bosi P., De Sordi N., Lalatta-Costerbosa G., 2011. Distribution, organization and innervation of gastric MALT in conventional piglet. *J. Anat*. 219(5):611-621

McCormack W. T., Tjoelker L. W., Thompson C. B., 1991. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu. Rev. Immunol*. 9:219-241

Mechado J. G., Hyland K. A., Dvorak Ch. M. T., Murtaugh M. P., 2005. Gene expression profiling of jejunal Peyer´s patches in juvenile and adult pigs. *Mammalian Genome.* 16(8):599-612

Melchers F., Karasuyama H., Haasner D., Bauer S., Kudo A., Sakaguchi N., Jameson B., Rolink A., 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol. Today*. 14(2):60-68

Melchers F., ten Boekel E., Yamagami T., Andersson J., Rolink A., 1999. The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol*. 11(5):301-317

Minatis O. P., Jol D., 1978. Gnotobiotic pigs-derivation and rearing. *Can. J. Med*. 42:428-437

Motyka B., Reynolds J. D., 1991. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Payer´s patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection. *Eur J Immunol*. 21(8):1951-1958

Mowat A. M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 3(4):331-341

Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., Honjo T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102(5):553-563

Nemazee D., Weigert M., 2000. Revising B cell receptors. *J Exp Med*. 191(11):1813-7

Newberry R. D., 2008. Intestinal lymphoid tissues: is variety an asset or a liability?. *Curr Opin Gastroenterol*. 24(2):121-128

Olin M. R., Hwa C. K., Lee J., Molitor T. W., 2005. gd T-lymphocyte cytotoxic activity against Mycobacterium bovis analyzed by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 297(1-2):1-11

Pabst R., Rothkötter H. J., 1999. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72:167-173

Pabst O., Bernhardt G., Förster R., 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol*. 82(4): 795-800

Parng C. L., Hansal S., Goldsby R. A., Osborne B.A., 1996. Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle. *J Immunol*. 157(12): 5478-5486

Paul P. W., editor. 2003. Fundamental Immunology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Pescovitz M. D., Lowman M. A., Sachs D. H., 1988. Expression of T-cell associated antigen by porcine natural killer cells. *Immunology*. 65:267-271

Press C. M., Reynolds J. D., McClure S. J., Simpson-Morgan M. W., Landsverk T., 1996. Fetal lambs are depleted if IgM+ cells following a single injection of an anti-IgM antibody early in gestation. *Immunology*. 88(1): 28-34

Ratcliffe M. J., 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol.* 30(1-2):101-118

Reynaud C. A., Dahan A., Anquez V., Weill J. C., 1989. Somatic hyperconversion diversities the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*. 59(1):171-183

Reynaud C. A., Mackay C. R., Müller R. G., Weill J. C., 1991. Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer´s patches. *Cell*. 64(5):995-1005

Reynolds J. D., Morris B., 1983. The influence of gut function on lymphoid cell populations in the intestinal mucosa of lambs. *Immunology*. 49(3):501-509

Reynolds J. D., Morris B., 1984. The effect of antigen on the development of Peyer´s patches in sheep. *Eur J Immunol*. 14(1): 1-6

Reynolds J. D., 1986. Evidence of extensive lymphocyte death in sheep Peyer´s patches. I. A comparison of lymphocyte production and export. *J Immunol*. 136(6): 2005-2010

Reynolds J. D., 1987. Mitotic rate maturation in the Peyer´s patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *Eur J Immunol*. 17(4): 503-507

Rothkötter H. J., Kirchhoff T., Pabst R. 1994. Lymphoid and non – lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut* 35:1582-1589

Rothkotter H. J., Pabst R., 1989. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer´s patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Imunology* 67: 103-108

Saalmüller A., Hirt W., Reddehase M. J., 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol*. 19(11):2343-2346

Saalmüller A., Hirt W., Maurer S., Weiland E., 1994. Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology*. 81: 578-583

Schwarz E., Saalmüller A., Gerner W., Claus R., 2005. Intraepithelial but not lamina propria lymphocytes in the porcine gut are affected by dexamethasone treatment. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105:125-139

Spencer J., Barone F., Dunn-Walters D., 2009. Generation of Immunoglobulin diversity in human gut-associated lymphoid tissue. *Semin Immunol*. 21(3): 139-146

Summerfield A., Saalmüller A., 1998. Interleukin-2 dependent selective activation of porcine gd T lymphocytes by an extract from the leaves of Acantospermum hispidum. *Int J Immunopharmacol*. (1-3):85-98

Šinkora J., Rehakova Z., Sinkora M., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H., Bianchij A. T. J., De Geust B., 1998a. Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology* 95:443-449

Šinkora M., Šinkora J., Řeháková Z., Šplíchal I., Yang H., Parkhouse R. M. E., Trebichavský I., 1998b. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology*. 95(4):595-603

Šinkora M., Šinkora J., Řeháková Z., Butler J. E., 2000a. Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J immunol*. 15, 165(4):1832-1839

Šinkora M., Sun J., Butler J. E., 2000b. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. V. VDJ chimeras resembling gene conversion products are generated at high frequency by PCR in vitro. *Mol. Immunol*. 37(17):1025-1034

Šinkora M., Sun J., Christenson R. K., Ford S. P., Butler J. E., 2003. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. B-cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *J. Immunol*. 15,170(4):1781-1788

Šinkora M., Sinkorova J., Holtmeier W., 2005. Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. *Immunology*. 115(4):544-555

Šinkora M., Sinkorova J., Cimburek Z., Holtmeier W., 2007. Two groups of porcine TCRgammadelta+ thymocytes behave and diverge differently. *J Immunol*. 178(2):711-719

Šinkora M., Butler J., E., 2009. The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 33:273-283

Šinkora M., Stepanova K., Butler J., E., Francis D., Santiago-Mateo K., Potockova H., Karova K., Sinkorova J., 2011. Ileal Peyer´s Patches Are Not Necessary for Systemic B Cell Development and Maintenance and Do Not contribute Significantly to the Overall B Cell Pool in Swine. *The Journal of Immunology*. 187: 000-000

Štěpánová K., Sinkora M., 2011. The expression of CD25, CD11b, SWC1, SWC7, MHC-II, and family of CD45 molecules can be used to characterize different stages of γδ T lymphocytes in pigs. *Dev. Comp. Immunol*. 36(4):728-740

Šterzl J., Silverstein A. M., 1967. Developmental aspects of immunity. *Adv. lmmunol.* 6:337-459.

Toman M. 2009. Veterinární imunologie: 2., doplněné a aktualizované vydání. 2nd ed. Praha: Grada Publishing a.s.

Tonegawa S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 302(5909):575-581

Vega – López M. A., Arenas – Contreras G., Bailey M., Gonzáles – Pozos S., Stokes C. R., Ortega M. G., Mondragon – Flores R., 2001. Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine. *Developmental Immunology* 8(2):147-158

Wang H., Clarke R. M., 2004. Regulation of B-cell development by antibody specifity. *Curr. Opin. Immunol.* 16(2):246-250

Weill J. C., Reynaud C. A., 1998. Galt versus bone marrow models of B cell ontogeny. *Dev Comp Immunol.* 22(3):379-385

Xu J. L., Davis M. M., 2000. Diversity in the CDR2 region of V(H) is sufficient for most antibody specifities. *Immunity*. 13(1): 37-45

Yang H., Parkhouse R., M., 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood an lymphoid tissues. *Immunology*. 89 (1):76-83

Yang W. C., Schultz R. D., 1986. Ontogeny of natural killer cell activity and antibody dependent cell mediated cytotoxicity in pigs. Dev Comp Immunol 10(3):405-418

Yasuda M., Jenne C. N., Kennedy L. J., Reynolds J. D., 2006. The sheep and cattle Peyer´s patch as a site of B-cell development. *Vet. Res*. 37(3):401-415

Zou X., Piper T. A., Smith J. A., Allen N. D., Xian J., Brüggemann M., 2003. Block in development at the pre-B-II to immature B cell sta*ge* in mice without Ig kappa and Ig lambda light chain. *J Immunol*. 170(3):1354-1361

10 PŘÍLOHY

Jako příloha je připojen článek, který obsahuje část výsledků této práce.

Sinkora M., Stepanova K., Butler J., E., Francis D., Santiago-Mateo K., Potockova H., Karova K., Sinkorova J., 2011. Ileal Peyer´s Patches Are Not Necessary for Systemic B Cell Development and Maintenance and Do Not contribute Significantly to the Overall B Cell Pool in Swine. *The Journal of Immunology*. 187(10): 5150-5161.