

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Denisa Dolečková

**Interaktom N-terminální domény IL-1 α
Interactome of IL-1 α N-terminal domain**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha, 2011

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, 9.9.2011

Denisa Dolečková

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D. a Mgr. Blance Zámostné za odborné vedení, cenné rady a velkou trpělivost, které mi poskytovali při tvorbě této práce.

Poděkovat bych chtěla také celému kolektivu Laboratoře biochemie RNA, paní laborantce Vlastě Pelechové za pomoc a přátelské prostředí a Mgr. Ondřeji Šebestovi za pomoc s fluorescenční mikroskopií.

Interakce N-terminální domény IL-1 α

Cytokiny jsou vysoce účinné mediátory produkované nejrůznějšími buněčnými typy v rámci imunitního systému i mimo něj za účelem ovlivnění směru, intenzity a doby trvání imunitní odpovědi a zánětlivého procesu. Jejich biologické efekty zprostředkované vazbou na vysokoafinitní membránové receptory a spuštěním dráhy signální transdukce jsou většinou dobře definované. Stále častěji se však ukazuje, že některé cytokiny mohou kromě exokrinní funkce působit také intrakrině. Pro takové cytokiny se vžil označení „cytokiny s duální funkcí“.

Jedním z těchto cytokinů je interleukin-1 α , u kterého se v poslední době výzkum zaměřil na nalezení jeho intracelulárních funkcí. Intracelulární funkce interleukinu-1 α zatím nebyla přesně definována. Pro její existenci však, kromě absence klasické hydrofóbní sekretorické sekvence, svědčí také fakt, že v rámci jeho prekurzoru obsažený N-terminální peptid je vysoce konzervovaný a obsahuje jaderný lokalizační signál.

Cílem této práce je definovat podmínky lokalizace N-terminálního peptidu interleukinu-1 α v různých buněčných kompartmentech a pomocí fluorescenční mikroskopie studovat proteiny potenciálně s ní interagující.

Klíčová slova: Interleukin-1 α , N-terminální doména IL-1 α , duální cytokin, intrakrin, jaderná relokace, tumor supresorový protein p53

Interactome of IL-1 α N-terminal domain

Cytokines are highly effective mediators produced by various cell types within and outside of the immune system with the aim to influence the orientation, intensity, and duration of the immune response and inflammatory process. Their biological effects mediated through binding the high-affinity membrane receptors and triggering the signal transduction pathway are usually well defined. However, as it is more and more frequently observed, in addition to the exocrine function, some cytokines may show intracrine effects. For this type of cytokines, the term “dual function cytokines“ has been adopted.

One of these cytokines is Interleukin-1 α , in which the recent research has concentrated on determining its intracellular functions. The intracellular function of interleukin-1 α has not been clearly defined so far. However, apart from the absence of the conventional hydrophobic sequence, its existence is supported by the fact that the N-terminal peptide included in its precursor is highly conserved and contains nuclear localization signal.

The aim of this work is to define the conditions of localization of the interleukin-1 α N-terminal domain in different cellular compartments and to study proteins potentially interacting with it using fluorescent microscopy.

Key words: Interleukin-1 α , N-terminal domain of IL-1 α , dual cytokine, intracrine, nuclear relocalization, tumor suppressor protein p53

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratek	8
1 Úvod	12
2 Přehled literatury	13
2.1 Cytokiny	13
2.1.1 Generalizovaná zánětlivá odpověď	13
2.1.2 Duální funkce některých cytokinů	14
2.2 Rodina interleukinu-1 (IL-1F/„Interleukin-1 family“)	16
2.3 Interleukin 1	18
2.4 Interleukin-1 α	20
2.4.1 Prekurzor IL-1 α (pro-IL-1 α)	22
2.4.2 N-terminální doména IL-1 α (NTP IL-1 α ; IL-1 NTP; pp-IL-1 α)	24
2.5 Cytokiny z rodiny interleukinu-1 s duální funkcí	28
2.5.1 IL-33 (IL-1F11)	28
2.5.2 IL-37 (IL-1F7)	29
3 Materiál a metody	32
3.1 Vybavení	32
3.2 Materiál	33
3.2.1 Chemikálie	33
3.2.2 Soupravy pro manipulaci s DNA	34
3.2.3 Roztoky	35
3.2.4 Biologický materiál	35
3.2.5 Kultivační média	36
3.2.6 Transfekční média	37
3.2.7 Transfekční reagensie	37
3.2.8 Protilátky	37
3.2.9 Roztoky používané pro přípravu preparátů na mikroskopii	37
3.2.10 Vektory	37
3.2.11 Primery (Generi Biotech)	38
3.2.12 DNA modifikující enzymy	38
3.2.13 Pufry pro restrikční endonukleázy, DNA polymerázy a T4 DNA ligázu	38
3.2.14 Standardy velikostí a množství DNA	39
3.3 Metody	39
3.3.1 Práce s DNA	39
3.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	43
3.3.3 Práce s bakteriemi	46
3.3.4 Práce s buněčnými kulturami	47
3.3.5 Transfekce savčích buněčných linií	49
4 Výsledky	54
4.1 Příprava rekombinantního vektoru pEGFP-C1/NTP	54
4.1.1 Štěpení plazmidu pcDNA4 NTP a vektoru pEGFP-C1	54
4.1.2 Ligace fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru pEGFP-C1	56
4.1.3 Transformace bakterií ligační směsí fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru pEGFP-C1	56
4.1.4 Ověření vložení NTP domény IL-1 α do vektoru pEGFP-C1/NTP pomocí PCR	56

4.1.5	Ověření vložení NTP domény IL-1 α do vektoru pEGFP-C1/NTP štěpením restrikcí endonukleázami	57
4.1.6	Zálohování pozitivních klonů <i>E. coli</i> nesoucích plazmid pEGFP-C1/NTP	57
4.2	Příprava rekombinantního vektoru MigR1/NTP	58
4.2.1	Štěpení plazmidu pcDNA4-NTP a vektoru MigR1	58
4.2.2	Ligace fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru MigR1	59
4.2.3	Transformace bakterií ligační směsí fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru MigR1	59
4.3	Transientní transfekce savčí buněčné linie Mrc-5	60
4.3.1	Optimalizace transfekční účinnosti u savčí buněčné linie Mrc-5 pomocí různých transfekčních agens	62
4.3.2	Lokalizace NTP IL-1 α u savčí buněčné linie Mrc-5	65
4.3.3	Vliv konfluence na lokalizaci NTP IL-1 α u savčí buněčné linie Mrc-5	66
4.4	Ovlivnění buněčné lokalizace NTP IL-1 α u savčí buněčné linie Mrc-5	67
4.4.1	Ovlivnění lokalizace působky v médiu	67
4.4.2	Ovlivnění buněčné lokalizace NTP-IL-1 α prostřednictvím UV	72
4.5	Indukce p53	73
5	Diskuze	77
6	Souhrn	81
7	Seznam citované literatury	82

Seznam zkratek

A	adenin
AK	aminokyselina, aminokyselinový zbytek
ASC	„Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain“
AP-1	transkripční faktor
ATP	adenosintrifosfát
bp	„base pair“ - pár bází
BSA	bovinní sérum albumin
CARD	„caspase recruitment domain“
CCL27	„Chemokine (C-C motif) ligand 27“
Da	dalton
DAMP	„damage-associated molecular patterns“
DAPI	4,6-diamino-2-fenyloindol
ddH ₂ O	demineralizovaná voda
dH ₂ O	deionizovaná voda
DIC	Nomarského diferenciální interferenční kontrast
DNA	kyselina deoxyribonukleová
MDM2	negativní regulátor tumor supresorového proteinu p53
DME	„Dulbecco's modified Eagle's medium“ – médium pro kultivaci savčích buněk
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfáty
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“ – varianta zeleného fluorescenčního proteinu
F	farad ($\text{m}^{-2} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^4 \cdot \text{A}^2$)
FBS	fetální bovinní sérum

FRET	„Förster resonance energy transfer/fluorescence resonance energy transfer”
g	tíhové zrychlení
HAT	histonacetyltransferáza
HAX-1	„HCLS1 associated protein X-1“
HMGB1	„High mobility group box 1“
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cells“
H2A-H2B	dimer histonů H2A-H2B
H4	histon H4
icIL-1Ra	intracelulární antagonist receptoru pro interleukin-1
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-1	interleukin-1
IL-1 α	interleukin-1 alfa
IL-1 β	interleukin-1 beta
IL-1F4	interleukin-18
IL-1F7	interleukin-37
IL-1F11	interleukin-33
IL-3	interleukin-3
IL-6	interleukin-6
IL-16	interleukin-16
IL-18	interleukin-18 (IL-1F4)
IL-18BP	„interleukin-18 binding protein“
IL-18 R	receptor IL-18
IL-18R α	α -řetězec receptoru pro interleukin-18
IL-33	interleukin-33 (IL-1F11/NF-HEV)
IL-37	interleukin-37 (IL-1F7)
IL-1F	„Interleukin-1 family“
IL-1R I	receptor IL-1 typu I
IL-1Ra	antagonista receptoru pro interleukin-1
IL-1RacP	„IL-1 receptor accessory protein“
J	joule ($\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$)

kDa	kilodalton (1000Da)
LN ₂	kapalný dusík
LPS	lipopolysacharid
M	mol/l
mat IL-1 α	maturovaný IL-1 α
MIF	„macrophage migration inhibitory factor“
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NALP3	„LRR and PYD domains-containing protein 3“
NF κ B	transkripční faktor
NF-HEV	„Nuclear Factor from High Endothelial Venules“
NK	„natural killers“
NLR	„NOD-like receptor“
NLRP3	„Nucleotid-binding domain Leucin-rich repeat containig Receptor Protein“
NOD	„nucleotide-binding and oligomerization domain“
NTP	N-terminální peptid
OD	optická denzita
PAMP	„pathogen associated molecular patterns“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“ – fosfátový pufr
PCAF	p300/CREB-binding protein-associated factor
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PESKY	intracelulární forma CCL27
pro-IL-1 α	prekurzor IL-1 α
pro-IL-16	prekurzor IL-16
PRR	„Pattern Recognition Receptors“
p300	transkripční koaktivátor
RAGE	“Receptor for Advanced Glycation Endproducts”
RNA	ribonukleová kyselina
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferáza
SDS	dodecylsulfát sodný
Smad3	transkripční faktor

TGF	transformující růstový faktor
TIR	„Toll/interleukin-1 receptor“
TLR	„Toll-like receptor“
TNF	„tumor necrosis factor“
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U	jednotka
UV	ultrafialové záření
V	volt ($\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3} \cdot \text{A}^{-1}$)
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
°C	stupeň Celsia ($t/^{\circ}\text{C} = T/\text{K} - 273,15$)
κ	kappa
Ω	ohm ($\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3} \cdot \text{A}^{-2}$)

1 Úvod

Cytokiny představují důležitou složku imunitního systému. Biologické účinky extracelulárních forem cytokinů jako mediátorů imunitní odpovědi, které po vazbě na odpovídající receptor spustí dráhu signální transdukce a v cílové buňce vyvolají adekvátní reakci, jsou většinou známy. Stále častěji se však ukazuje, že některé cytokiny mohou mít kromě svého pleiotropního účinku v klasické podobě také další funkce.

Interleukin-1, první číslovaný cytokin a jeden ze základních mediátorů imunitní odpovědi s pleiotropními účinky přesahujícími rámec imunitního systému čtvrt století po svém objevení zapadl i do soukolí moderních imunologických teorií když byla odhalena jeho nová funkce jako molekuly která má parametry DAMP („Damage Associated Molecular Patterns“).

V poslední době se výzkum interleukinu-1 zaměřil na možné intracelulární funkce tohoto cytokinu, které nebyly zatím přesně definovány, ale pro jejichž existenci svědčí několik indicií. Jedna z forem tohoto cytokinu, interleukin-1 α je produkován jako prekurzor a kromě absence klasické sekretorické sekvence obsahuje v rámci své vysoce konzervované N-terminální domény jaderný lokalizační signál. Byla prokázána schopnost jaderné translokace této N-terminální domény a lze proto předpokládat, že se nejedná pouze o vedlejší produkt prekurzoru na maturovaný cytokin.

Cílem této práce je zkonstruovat rekombinantní vektor nesoucí gen pro N-terminální doménu interleukinu-1 a prostřednictvím transientní transfekce do lidské buněčné linie studovat subcelulární lokalizaci N-terminální domény interleukinu-1 α v závislosti na různých kultivačních podmínkách a fyzikálních faktorech a pomocí fluorescenční mikroskopie studovat proteiny potenciálně interagující s N-terminální doménou interleukinu-1 α .

2 Přehled literatury

2.1 Cytokiny

Cytokiny jsou mediátory imunitní odpovědi produkované nejrůznějšími buněčnými typy v rámci imunitního systému i mimo něj. Jedná se o vysoce účinné molekuly zahrnuté do vrozené i specifické imunity. Jsou to proteiny, často glykosylované, produkované za účelem ovlivnění směru, intenzity a doby trvání imunitní odpovědi a zánětlivého procesu. Zároveň jsou důležité pro udržení homeostázy za fyziologického stavu. Charakteristickými vlastnostmi cytokinů jsou pleiotropie, redundance a synergie resp. antagonie. Účinkují v extrémně nízkých koncentracích (10^{-9} až 10^{-12}), jsou tedy vysoce biologicky aktivní. Jednotlivé cytokiny bývají v průběhu fylogeneze značně konzervovány. Vůči hormonům jsou vymezeny tím, že jedna buňka může produkovat, a většinou také produkuje, více cytokinů a dále tím, že, zejména tzv. typické cytokiny, jsou produkovány až po stimulaci buňky adekvátním podnětem. Působí prostřednictvím vysokoafinitních receptorů na povrchu buněk a jejich signál často vede ke změně exprese genů v cílových buňkách. Ovlivňují tvorbu dalších cytokinů, jejichž synergistické a antagonistické interakce vytváří jakousi kaskádu, propojení do tzv. cytokinové sítě. Pokud se regulace této kaskády vymkne kontrole, výsledkem může být nekontrolovatelný zánětlivý proces, poškození buněk a tkání.

2.1.1 Generalizovaná zánětlivá odpověď

Generalizovaná zánětlivá odpověď je zahájena prostřednictvím receptorů PRR („Pattern Recognition Receptors“), které jsou umístěny na povrchu či uvnitř buněk vrozené imunity (monocyty, makrofágy, neutrofilové). Jejich podskupinu tvoří Toll-like receptory (TLR) nezbytné pro vlastní zahájení imunitní odpovědi. Toll-like receptory (TLR) mají schopnost vázat struktury charakteristické pro mikroorganismy (PAMP/„Pathogen Associated Molecular Patterns“) a také

některé endogenní molekuly uvolňující se z buněk v důsledku poškození tkáně označované jako alarminy. Taková vazba vyvolá v buňkách fagocytů spuštění tzv. inflamazómové signální cesty, v jejímž závěru dojde k aktivaci enzymu kaspázy-1 a následně k tvorbě klíčového cytokinu zánětlivé reakce, interleukinu-1 β . Souběžně s inflamazómovou signální cestou je spuštěna také signalozómová signální dráha, vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF κ B, indukujícího expresi řady prozánětlivých cytokinů. Struktury charakteristické pro mikroorganismy (PAMP) a alarminy se mohou vzájemně synergicky posilovat jak prostřednictvím receptorové signalizace, tak aktivací transkripce (BIANCHI, 2007). Alarminy společně se strukturami charakteristickými pro mikroorganismy (PAMP) tvoří tzv. DAMP („Damage Associated Molecular Patterns“), tedy struktury signalizující nebezpečí v důsledku poškození tkáně mikroorganismy nebo jako následek traumatického děje. V nedávné době se ukázalo, že některé klasické cytokiny, případně některé jejich formy, normálně působící prostřednictvím membránových receptorů a drah signálních transdukci mohou mít za určitých okolností roli DAMP.

Cytokiny působí nejčastěji parakrinně, často autokrinně, endokrinně a jak se stále častěji ukazuje, také intrakrinně.

2.1.2 Duální funkce některých cytokinů

V roce 2003 byl v Intrakrinní hypotéze Richardem N. Re definován pojem intrakrin. Ve smyslu této hypotézy jsou intrakriny proteiny schopné kromě extracelulární signalizace pomocí membránových receptorů zároveň intracelulární vazby na buněčné struktury nesouvisející se sekrečními nebo degradačními dráhami (RE, 2003; RE a COOK, 2006).

Cytokiny, u kterých byla kromě jejich exokrinní funkce prokázána také intracelulární - intrakrinní funkce, nebo u kterých se o takové funkci uvažuje, jsou označovány jako tzv. cytokiny s duální funkcí. Působí tedy jak exokrinně, jako mediátory uvolňované z produkčních buněk a působící prostřednictvím membránových receptorů, tak intrakrinně, ať už po internalizaci nebo přímo

v buňce, která je exprimuje (LUHESHI et al., 2009 b). Jejich exokrinní a intrakrinní funkce spolu přitom nemusí souviset, a je pravděpodobné, že exokrinní formy cytokinů s duální funkcí se v průběhu evoluce vyvinuly z intracelulárních molekul s DNA vazebným motivem, přes protein-proteinové interakce až k ligandům membránových receptorů (WERMAN et al., 2004). Duální cytokiny sdílejí jisté společné rysy jako cytosolickou translokaci, neklasický způsob sekrece a jadernou lokalizaci v buňkách, které jsou jejich producenty (LUHESHI et al., 2009 b).

Jako typický příklad proteinu s duální funkcí se často uvádí HMGB1 („High Mobility Group Box 1“). Jedná se o jaderný, DNA vazebný protein ovlivňující transkripci díky schopnosti remodelace chromatinu, čímž usnadňuje přístup transkripčním faktorům. Ukázalo se také, že se po uvolnění z poškozených nebo nekrotických buněk do extracelulárního prostoru se chová jako DAMP (SCAFFIDI et al., 2002) a vykazuje atributy endogenního adjuvans (ROVERE-QUERINI et al., 2004). Navíc může být jako cytokin uvolňován cíleně z monocytů či makrofágů vystavených působení lipopolysaridu, prozánětlivých cytokinů či oxidu dusnatého (PISETSKY et al., 2008), nebo z aktivovaných dendritických buněk (LOTZE a TRACEY, 2005). V takovém případě po vazbě na membránové receptory TLR2, TLR4 a RAGE (PISETSKY et al., 2008) spouští dráhu signální transdukce. V případě HMGB1 byla nejprve známa a studována jeho jaderná funkce a v průběhu času byly odhaleno jeho extracelulární působení. U interleukinu-1 je tomu naopak. Biologické účinky jeho extracelulárních forem jsou studovány již čtvrt století. Teprve nedávno byla odhalena jeho role alarminu (DAMP) ve sterilním zánětu (CHEN et al., 2007; EIGENBROD et al., 2008) a v poslední době se výzkum zaměřil na nalezení intracelulární funkce interleukinu-1.

Dalším příkladem cytokinu s duální funkcí je chemokin CCL27 („Chemokine (C-C motif) Ligand 27“) produkovaný bazálními keratinocyty za účelem návratu paměťových (“homing”) T-buněk do kůže během zánětlivého procesu. Alternativním sestřihem vzniká nesekretovaná forma schopná jaderné translokace,

jejímž důsledkem jsou morfologické změny. Bývá označovaná jako PESKY a je produkována rozličnými buněčnými typy. Také sekretovaná forma může po vazbě na receptor a internalizaci tohoto komplexu vstupovat do jádra s dosud neznámými důsledky (NIBBS a GRAHAM 2003).

Za cytokin s duální funkcí je považován také interleukin-16 (IL-16). Maturovaný interleukin-16 je peiotropní cytokin. Buňkami je produkován jako prekurzor pro-IL-16, ze kterého je v průběhu maturace prostřednictvím caspázy-3 odštěpena vysoce konzervovaná N-terminální doména obsahující jaderný lokalizační signál. Tato N-terminální doména má schopnost jaderné translokace a jejím působením dochází k zastavení buněčného cyklu ve fázi G_0/G_1 (ZHANG et al., 2001).

Intracelulární funkce byly studovány také u MIF („macrophage migration inhibitory factor“) (KLEEMANN et al., 2000), interferonu- γ (IFN- γ) (AHMED et al., 2003), interleukinu-6 (IL-6) (ALBERTI et al., 2004) a interleukinu-3 (IL-3) (DUNBAR et al., 1989).

V rodině interleukinu-1 nalezneme tři cytokiny s prokázanou nebo předpokládanou duální funkcí. Kromě interleukinu-1 α jsou to interleukin-33 (IL-33/IL-1F11) a interleukin-37 (IL-37/IL-1F7).

2.2 Rodina interleukinu-1 (IL-1F/„Interleukin-1 family“)

Rodinu interleukinu-1 tvoří až na jednu výjimku prozánětlivé cytokiny.

Do rodiny interleukinu-1 je v současné době řazeno 11 proteinů, které sdílejí podobnou terciální strukturu. Ta je tvořena β -barelem s 12 β -listy v antiparalelním uspořádání. Strukturně homologickou terciální strukturu mají proteiny FGF („Fibroblast Growth Factor“) rodiny (ZHU et al., 1991). Tato proteinová rodina však sdílí s rodinou interleukinu-1 jen malou sekvenční podobnost a také biologické účinky jsou rozdílné (KUMAR et al., 2000).

Proteiny rodiny interleukinu-1 jsou kódovány 11 různými geny. Z nich 9 se u člověka nachází na druhém chromozomu (TAYLOR et al., 2002). Gen pro interleukin-18 (IL-1F4) leží u člověka na chromozomu 11 (NOLAN et al. 1998) a gen pro interleukin-33 (IL-1F11) je na chromozomu 9 (SCHMITZ et al., 2005).

Intron-exonové uspořádání genů rodiny interleukinu-1 svědčí pro společného předka, u něhož došlo k duplikaci (EISENBERG et al., 1991). V současné době je za původní formu považován interleukin-1 α (IL-1 α) (DINARELLO, 2010; MOHAN a YU, 2010).

Ačkoliv u většiny členů rodiny interleukinu-1 byla nalezena jejich extracelulární funkce, pouze gen pro antagonistu receptoru pro IL-1 kóduje klasickou signální sekvenci směřující protein k sekreci. S výjimkou interleukinu-1 β a interleukinu-1 α (viz kapitola Interleukin-1 α) není zcela jasné, jakým způsobem dochází k případné sekreci ostatních členů rodiny interleukinu-1 (SIMS a SMITH, 2010). Interleukin-1 α a interleukin-33 (IL-1F11) jsou biologicky aktivní i jako prekurzory. Stejně tak jsou v prekurzorové formě biologicky aktivní IL-1F5, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9. Je ale možné, že maturací se biologická aktivita posledně jmenovaných interleukinů zvyšuje (SIMS a SMITH, 2010).

Prekurzory interleukinu-1 β a interleukinu-18 (IL-1F4) jsou neaktivní. K jejich maturaci dochází odštěpením N-terminální domény cysteinovou proteázou, kaspázou-1. Proces vedoucí k aktivaci kaspázy-1 začíná vazbou adekvátního ligandu na receptor NALP3 (NLRP3/„Nucleotid-binding domain Leucin-rich repeat containing Receptor Protein“). NALP3 je v cytosolu lokalizovaný receptor nespecifické části imunitního systému, součást rodiny NLR, tedy jeden z podtypů tzv. NOD-like receptorů. Po aktivaci NALP3 vytvoří multi-proteinové komplexy, tzv. inflamazómy. Po vazbě ligandu dojde k multimerizaci NALP3 proteinů, PYRIN doména receptoru NALP3 interaguje s PYRIN doménou adaptorového proteinu ASC („Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain“), jehož doména CARD interaguje s CARD doménou prokaspázy-1, což vede k aktivaci kaspázy-1 s následným štěpením prekurzorů

IL-1 β a IL-18. Prostřednictvím PYRIN-PYRIN a CARD-CARD interakcí je vytvořeno lešení vhodné pro vazbu a aktivaci prokaspázy-1 (FRANCHI et al. 2009).

Zajímavé je, že struktura interleukinu-37 (IL-1F7) může být štěpena kaspázou-1 na dvou potenciálních místech. Tato maturace interleukinu-1F7 je nutná pro jadernou translokaci, ale není jasné, zda je nutná pro extracelulární funkce (SHARMA et al., 2008).

Antagonista receptoru pro interleukin-1 (IL-1Ra) je specifický inhibitor funkcí IL-1. Molekula, asi ze čtvrtiny totožná s interleukinem-1, se váže na receptory, ale nevyvolává fyziologickou odpověď. Existuje také v intracelulární formě (icIL-1Ra) (HASKILL et al., 1991).

2.3 Interleukin 1

Interleukin-1 je souhrnný termín používaný pro interleukin-1 α a interleukin-1 β . Oba příbuzné proteiny představují produkt dvou různých genů, které se u člověka nacházejí na chromozomu 2. Kromě nukleotidové sekvence se odlišují izoelektrickým bodem. Nukleotidové sekvence vykazují 45% podobnost a aminokyselinové sekvence se shodují přibližně z 26%. Ačkoliv ani jedna z forem interleukinu-1 neobsahuje typickou hydrofobní sekretorickou sekvenci, má se v současné době za to, že interleukin-1 β je sekretovanou formou interleukinu-1, zatímco interleukin-1 α je preferenčně intracelulární formou. Interleukin-1 α i interleukin-1 β jsou produkovány jako prekurzory, které jsou následně štěpeny specifickými proteázami na maturované formy.

Obě formy interleukinu-1 se s vysokou afinitou váží na stejné receptory a v tomto smyslu mají stejný biologický účinek. Vazbou interleukinu-1 na receptor IL-1 typu I (IL-1R I) se po vytvoření komplexu s přidavným proteinem IL-1RacP („IL-1 Receptor accessory Protein“) spouští dráhy signální transdukce. Prostřednictvím kaskády kináz dojde k uvolnění transkripčního faktoru NF- κ B, případně k aktivaci

transkripčního faktoru AP-1. Receptor pro interleukin-1 typu II (IL-1R II) má zkrácenou cytoplazmatickou část, chybí TIR doména, a po vazbě interleukinu-1 ke spuštění dráhy signální transdukce nedochází. Oba receptory se mohou vyskytovat také v solubilní formě v důsledku odštěpení jejich extracelulárních částí. Solubilní formy a receptor pro interleukin-1 typu II se mohou podílet na regulaci působení interleukinu-1 tím, že kompetují o dostupný interleukin-1.

Interleukin-1 α a interleukin-1 β jsou produkty hlavně monocytů, makrofágů a v menší míře i jiných buněk imunitního systému. Produkují je i buňky mimo imunitní systém např. keratinocyty, astrocyty, fibroblasty, epiteliální buňky, hepatocyty, chondrocyty a hladké svaly. Ve zvýšené míře jsou produkovány tkáněmi pod vlivem luteinizačního hormonu a u pacientů s metabolickým syndromem (DANDONA et al., 2005).

Transkripce interleukinu-1 je stimulovaná rozličnými faktory. Mohou to být součásti struktur patologických organismů nebo produkty jejich metabolismu jako např. lipopolysacharid a muramyl dipeptid. Z exogenních látek pak transkripci aktivují urátové a silikátové částice, hydroxid hlinitý, latex a zymosan. Produkce je stimulovaná součástmi komplementu, trombinem a některými cytokiny. Z fyzikálních faktorů aktivuje transkripci interleukinu-1 UV záření. Naopak významným inhibitorem produkce interleukinu-1 jsou kortikosteroidní hormony.

Interleukin-1 představuje jednu z klíčových molekul imunitního systému v akutním i chronickém zánětu a tvoří významnou součást tzv. cytokinové sítě, která zajišťuje regulaci a koordinaci různých složek obrany organismu v případě infekce, zánětu, poranění nebo stresu. Interleukiny IL-1 α a IL-1 β se uplatňují v hematopoezi a jsou růstovým a diferenciacním faktorem lymfocytů, působí také na monocyty, granulocyty a dendritické buňky. Amplifikují zánětlivou reakci zvýšením exprese prozánětlivých cytokinů např. interleukinu-2 a interleukinu-6 a jejich receptorů a adhezivních molekul na neutrofilech a buňkách endotelu cév. Také zvyšují cytotoxickou aktivitu NK buněk. Jeho působení však zdaleka není omezeno jen na imunitní systém. Interleukin-1 má rovněž vliv na normální růst a

morfogenezi mnoha typů buněk i na celkový metabolismus. Významně se podílí na regulaci tělesné teploty, spánku a krevního tlaku. Působí jako modulátor resorbce kostí a ovlivňuje hladinu vápníku v krvi. Zajímavá je prokázaná účast v nidaci embrya (SIMON et al., 1997). Představuje tedy protein s pleiotropním působením v organismu.

Interleukin-1 je často studován z hlediska účasti v patogenezi mnoha autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida, osteoporóza, lupénka, parodontóza, systémová skleróza, diabetes mellitus, Alzheimerova choroba či autoimunní encefalomyelitida. Jako zánětlivý faktor se interleukin-1 uplatňuje v patogenezi restenózy koronárních tepen (KASTRATI et al., 2000). Je také specifickým indikátorem a významným faktorem při rozvoji septického šoku, jeho působení vede k nárůstu produkce proteinů akutní fáze, prostaglandinů E2 a zvýšení exprese některých typů adhezivních molekul. Toto patogenní působení interleukinu-1 je v organismu inhibováno antagonistou receptorů interleukinu-1 (IL-1Ra). V některých případech lze k léčbě využít rekombinantní IL-1Ra známý pod názvem Anakinra. Ke zmírnění příznaků osteoartritidy je dostupná experimentální terapie autologním sérem obohaceným o antagonistu receptoru pro interleukin-1 (IL-1Ra) (BALTZER et al., 2009).

2.4 Interleukin-1 α

Interleukin-1 α je syntetizován jako 31 kDa prekurzor pro-IL-1 α . Může být enzymaticky štěpen Ca²⁺ aktivovanou proteázou calpainem na N-terminální doménu IL-1 α (NTP IL-1 α ; IL-1 NTP; 16 kDa; ak 1-112) a maturovaný cytokin IL-1 α (mat IL-1 α ; IL-1 α ; 17 kDa; ak 113-259) (KOBAYASHI et al., 1990). Všechny tři molekuly jsou biologicky aktivní. Prekurzorová forma a N-terminální doména IL-1 α obsahují jadernou lokalizační sekvenci (COHEN et al., 2010).

Specifickým inhibitorem proteázy calpainu je calpastatin a jeho působení může být jedním z mechanismů, který ovlivňuje zastoupení jednotlivých forem interleukinu-1 α uvnitř buněk (CARRUTH et al., 1991).

Interleukin-1 α je syntetizován především v monocytech a aktivovaných makrofázích. Konstitutivně se vyskytuje v buňkách mezenchymálního původu např. v keratinocytech, v buňkách endotelu a epiteliálních buňkách ledvin, plic a gastrointestinálního traktu (DINARELLO 2011).

V případě klasické zánětlivé odpovědi může být interleukin-1 α uvolněn makrofágy po aktivaci antigenem a působit chemotakticky na T-lymfocyty. Interleukin-1 α pak v místě působení navodí zvýšení hladin ostatních cytokinů, jako jsou IL-2, IL-6, TNF-alfa či PDGF (MAWATARI et al., 1989) a také zvýšení počtu molekul integrinů na endoteliálních buňkách (GAO et al., 1995).

Extracelulárně se interleukin-1 α vyskytuje jen vzácně (DINARELLO, 1996). Interleukin-1 α je *in vivo* v tělních tekutinách zdravých jedinců nedetekovatelný, přítomný je jen u závažných onemocnění (DINARELLO, 1996). Pro nepřítomnost interleukinu-1 α v extracelulárním prostoru svědčí výskyt neutralizačních protilátek proti IL-1 α u 5-28% zdravých jedinců (SAURAT et al., 1991; MIOSSEC, 2002). Případná sekrece interleukinu-1 α probíhá neklasickým způsobem, je závislá na přítomnosti měďnatých kationtů a dochází k ní za pomoci proteinu S100A13 (MANDINOVA et al., 2003). Proteiny S100A13 nacházející se v blízkosti vnitřní vrstvy plazmatické membrány po vazbě vápenatých kationtů vytvoří jakousi otevřenou konformaci připravenou vázat interleukin-1 α . Tím dojde k vytvoření heterotetrameru, který po interakci s měďnatými kationty prostoupí buněčnou membránou. V redukčním prostředí extracelulárního prostoru dojde k disociaci komplexu a interleukin-1 α se uvolní jako monomer v aktivní konformaci (MOHAN a YU, 2011). Mechanismus sekrece se stal předmětem studia kvůli závažnosti patologických stavů, při kterých k němu dochází. Obecně se dnes má ale spíše za to, že v naprosté většině případů je interleukin-1 α intracelulární formou interleukinu-1 a působí jako intrakrinní faktor ať už za fyziologických nebo patologických podmínek. Do nitra buňky se interleukin-1 α může dostat také receptorem zprostředkovanou endocytózou. Vzhledem

k přítomnosti jaderného lokalizačního signálu v sekvenci receptoru je možná i jaderná translokace celého komplexu (GRENFELL et al., 1989).

Interleukin-1 α má radioprotektivní potenciál (PERLSTEIN et al., 1995). Zvýšená hladina interleukinu-1 α je považována za vedlejší účinek ionizujícího záření na proteinové úrovni podobně jako zvýšení exprese tumor supresorového proteinu p53. Ke zvýšení produkce interleukinu-1 α v neozářených buňkách dochází také po transportu média z ozářených buněk (ÖSTERREICHER et al., 2003).

U epitelálních buněk pupečnickových cév („Human Umbilical Vein Endothelial Cells – HUVEC“) může být zvýšení exprese interleukinu-1 α považováno za specifický marker buněčné senescence. U kožních fibroblastů nebyla zvýšená exprese v senescenci prokázána (MARIOTTI et al., 2006).

2.4.1 Prekurzor IL-1 α (pro-IL-1 α)

Řada buněčných typů nemá schopnost štěpit prekurzor IL-1 α Ca²⁺ aktivovanou proteázou calpainem na maturovaný protein a N-terminální doménu (WERMAN et al., 2004). Prekurzor IL-1 α se konstitutivně vyskytuje v buňkách mezenchymálního původu, jako jsou keratinocyty, buňky endotelu cév, epitelií apod. (HAUSER et al., 1986; DINARELLO, 2011).

Uváděná intracelulární lokalizace prekurzoru IL-1 α se v různých studiích liší. Z novějších studií Cohen a kol. pozoroval převážně jadernou lokalizaci, kdy prekurzor IL-1 α byl asociován s chromatinem (COHEN et al., 2010). Werman a kol. uvádí difúzní lokalizaci v klidových buňkách s následnou jadernou translokací po aktivaci buněk zánětlivým stimulem (WERMAN et al., 2004). U mesangiálních buněk glomerulu po transienční transfekci Stevenson a kol. nepozoroval jadernou translokaci prekurzoru IL-1 α (STEVENSON et al., 1997). Je možné, že klidová lokalizace IL-1 α je tkáňově specifická (HU et al., 2003). Může být také ovlivněna mezibuněčnými kontakty, se zvyšující se konfluencí je jaderná lokalizace IL-1 α inhibována (LUHESHI et al., 2009 a). Jaderná translokace prekurzoru IL-1 α probíhá aktivně, je závislá na jaderném lokalizačním

signálu obsaženém v rámci N-terminální domény (WESSENDORF et al., 1993; LUHESHI et al., 2009 c) a kromě postranslačních modifikací N-terminální domény (HU et al., 2003) ji mohou ovlivňovat další proteiny, např. HAX-1 (KAWAGUCHI et al., 2006). Kineticky je prekurzor IL-1 α vysoce aktivní, dokud nedojde ke spuštění apoptózy, poté se jeho pohyblivost v rámci nukleoplazmy snižuje. V důsledku toho není během procesu apoptózy prekurzor IL-1 α uvolňován do extracelulárního prostoru (COHEN et al., 2010).

Do extracelulárního prostoru se prekurzor IL-1 α dostává při nekrotickém způsobu smrti buněk. Následně prostřednictvím aktivace signální dráhy IL-1R I v makrofázích působí prozánětlivě, např. indukcí tvorby IL-1 β a dalších prozánětlivých cytokinů. Má také chemotaktický účinek, vyvolává infiltraci neutrofilů a makrofágů do místa traumatu (MOSLEY et al., 1987; COHEN et al., 2010). Podobným způsobem, i když v tomto případě prostřednictvím maturovaného IL-1 α , ale nezávisle na TLR9 a NLRP3 resp. IL-1 β , dochází k rozvoji zánětu během adenovirové infekce (DI PAOLO et al., 2009).

Prekurzor IL-1 α může být díky myristylaci kotven v plazmatické membráně buněk (KURT-JONES et al., 1985; STEVENSON et al., 1993) a působit juxtakrinně (KAPLANSKI et al., 1994).

Po jaderné translokaci snižuje prekurzor interleukinu-1 α schopnost migrace buněk epiteliálního typu pravděpodobně prostřednictvím interakcí se strukturami cytoskeletu (McMAHON et al., 1997).

Význam intrakrinního působení prekurzoru IL-1 α byl studován u fibroblastů izolovaných od pacientů se systémovou sklerózou. V těchto fibroblastech je produkován konstitutivně a byla prokázána jeho jaderná lokalizace. Prekurzor IL-1 α má schopnost interakce se supresorem buněčné proliferace, s proteinem nazývaným necdin, který se na prekurzor váže v oblasti N-terminální domény IL-1 α . Současná produkce obou proteinů vede ke zvýšené proliferaci buněk a zvýšené produkci kolagenu. Je možné, že se tímto způsobem prekurzor IL-1 α

podílí na patogenezi systémové sklerózy. Přesný mechanismus není znám, interakce může znemožnit jak přímou interakci necdinu s DNA, tak jeho potenciální interakce s jinými transkripčními faktory (HU et al., 2003). Opačný účinek byl pozorován v transformovaných epiteliálních buňkách. Při endogenní expresi prekurzoru IL-1 α dochází ke snížení rychlosti proliferace a bylo naměřeno zvýšené množství mRNA pro kolagenázu a PAI-1 (MAIER et al., 1994).

2.4.2 N-terminální doména IL-1 α (NTP IL-1 α ; IL-1 NTP; pp-IL-1 α)

Proteolytickým odštěpením maturovaného IL-1 α Ca²⁺ aktivovanou proteázou calpainem se z prekurzoru IL-1 α uvolní N-terminální doména IL-1 α (KOBAYASHI et al., 1990).

N-terminální doména IL-1 α obsahuje sekvenci KVLKKRRL odpovídající jadernému lokalizačnímu signálu (WESSENDORF et al., 1993). Tato sekvence je u N-terminální domény IL-1 α evolučně absolutně konzervovaná u všech testovaných savčích organismů (STEVENSON et al., 1997).

Jaderný transport, případně aktivita N-terminální domény IL-1 α mohou být regulovány posttranslačními modifikacemi (STEVENSON et al., 1997). Popsány byly fosforylace (BEUSCHER et al., 1988) a myristylace (STEVENSON et al., 1993). Jako významnější se jeví myristylace lysinů na pozicích 82 a 83 (HU et al., 2003), fosforylace serinu na pozici 90 na jadernou lokalizaci pravděpodobně vliv nemá (POLLOCK et al., 2003). Jaderná translokace může být stimulována aktivací buněk zánětlivými podněty (WERMAN et al., 2004). Kawaguchi a kol. zjistil, že jaderná lokalizace prekurzoru IL-1 α je závislá na přítomnosti proteinu HAX-1. Zdá se, že HAX-1 interaguje s prekurzorem IL-1 α na třech různých místech v oblasti N-terminální domény. Jedno z těchto míst se nachází v oblasti jaderného lokalizačního signálu a pokrývá také aminokyselinu lysin v pozicích 82 a 83, na kterých může docházet k myristylaci. Protein HAX-1 je produkován mnoha různými typy buněk ve zdravých tkáních a byly prokázány jeho interakce s různými proteiny se strukturně odlišnými motivy. Společným znakem těchto proteinů je schopnost přesunovat se mezi jádrem a cytoplazmou (KAWAGUCHI

et al., 2006). Také vlastní N-terminální doména vytváří s proteinem HAX-1 stabilní komplexy (YIN et al., 2001). Zda se tato interakce podílí na jaderné translokaci N-terminální domény, nebo spíše umožňuje její cytoplazmatickou retenci, jak se původně domnívali Yin a kol., není zcela jasné. Stejně jako prekurzorová forma interleukinu 1 α je N-terminální doména kineticky vysoce aktivní, dokud nedojde ke spuštění apoptózy, poté se její pohyblivost v rámci nukleoplazmy snižuje (COHEN et al., 2010). V jádře dochází ke zvýšené koncentraci N-terminální domény v jaderných skvrnách „nuclear speckles“ a byla prokázána její kolokalizace s transkripčním koaktivátorem p300 (POLLOCK et al., 2003; BURYSKOVA et al., 2004; LUHESHI et al., 2009 a).

Zatímco produkce prekurzoru IL-1 α byla prokázána v mnoha typech buněk a tkání, přirozeně se vyskytující, volná N-terminální doména byla v buněčném extraktu zatím detekována pouze u makrofágů (STEVENSON et al., 1993; POLLOCK et al., 2003; DI PAOLO et al., 2009). Přesto se v posledních letech řada autorů pokouší o nalezení intracelulární, případně jaderné funkce N-terminální domény IL-1 α . Předpokládají, že vzhledem ke schopnosti jaderné translokace a vysoké míry konzervovanosti (YIN et al., 2001) je málo pravděpodobné, že by se jednalo pouze o vedlejší produkt štěpení prekurzoru IL-1 α na maturovaný IL-1 α (BURYSKOVA et al., 2004).

Přesná funkce N-terminální domény není známa. Prozánětlivé působení intracelulárních forem IL-1 α podporuje poznání, že nadprodukce prekurzoru i N-terminální domény vede k intracelulární aktivaci transkripčních faktorů NF κ B a AP-1 s následnou produkcí některých prozánětlivých cytokinů. Prekurzor i N-terminální doména u stabilně transfekovaných buněk způsobují zvýšení senzitivity vůči následné stimulaci pomocí IFN- γ a TNF- α , tedy cytokinů, jejichž imunomodulační účinek je dávkově a časově závislý. Navíc N-terminální doména intrakrinně stimuluje produkci IL-1 α ve smyslu pozitivní zpětné vazby. Vše nezávisle na extracelulární stimulaci receptoru pro IL-1 (IL-1R) (WERMAN et al., 2004).

Stevenson a kol. prokázali, že za specifických podmínek může N-terminální doména u trvale transfekovaných buněk vyvolat maligní transformaci (STEVENSON et al., 1997).

Jedna ze studií prokázala, že ektopická exprese N-terminální domény IL-1 α po transfekci buněk nádorových linií retrovirovými vektory vede k indukci apoptózy. Pravděpodobná interakce N-terminální domény s komponentami sestřihového aparátu RNA způsobí zvýšení produkce proapoptotické sestřihové varianty proteinu Bcl-X (Bcl-X_s). U nenádorových buněčných linií k indukci apoptózy prostřednictvím N-terminální domény IL-1 α nedochází (POLLOCK et al., 2003). Otázkou zůstává, jakou roli při tomto procesu hraje simulace virové infekce retrovirovými vektory (BURÝŠEK, ústní sdělení). Blanka Zámostná z naší laboratoře v rámci své diplomové práce prokázala, že nadprodukce prekurzoru IL-1 α činí buňky infikované virem citlivější k apoptóze, zatímco bez virové infekce k apoptóze nedochází (VICENOVA, 2005).

Při adenovirové infekci je po interakci viru s povrchovými proteiny makrofágů stimulována jak produkce prekurzoru IL-1 α , tak i jeho štepení na maturovaný IL-1 α a N-terminální doménu, která je poté translokována do jádra (DI PAOLO et al., 2009). Jednou z možných funkcí N-terminální domény IL-1 α by mohla být protivirová obrana (BURYSKOVA et al., 2004). Prekurzor IL-1 α i N-terminální doména IL-1 α jako fúzní protein s Gal4 DNA vazebnou doménou transaktivují transkripci při použití systému UAS/GAL4 (BURYSKOVA et al., 2004). K transaktivaci dochází při použití N-terminální domény IL-1 α v menší míře než u prekurzoru IL-1 α , maturovaný IL-1 α tuto schopnost nemá (WERMAN et al., 2004). Mutační analýza odhalila v rámci NTP IL-1 α dva α -helixy, zodpovědné za transaktivaci transkripce IL-1 α v UAS/GAL4 systému. Tyto acidické α -helixy jsou evolučně vysoce konzervované. Nachází se na obou koncích N-terminální domény. Odstranění ať už N-terminálního nebo C-terminálního α -helixu výrazně sníží transaktivaci, odstranění obou α -helixů ho zruší úplně. K transaktivaci dochází za předpokladu neporušeného transkripčního koaktivátoru p300 u savčích buněk resp. jemu analogickému SAGA komplexu u kvasinek.

Transkripční koaktivátor p300 tvoří součást histonacetyltransferázového komplexu PCAF, a i sám p300 má histonacetyltransferázovou aktivitu. SAGA komplex je kvasinková obdoba PCAF. Histonacetyltransferázové komplexy jsou enzymy katalyzující přenos acetylového zbytku na N-konce histonů. Acetylace histonů je spojena s transkripčně aktivním stavem. Změnou náboje histonů dojde k rozvolnění struktury nukleozomového vlákna, čímž je usnadněn přístup transkripčnímu aparátu buňky. Vzhledem k potenciálu některých virových faktorů inhibovat transkripci protivirových a prozánětlivých genů právě prostřednictvím interakce s p300, dohromady se schopností rychlé syntézy a aktivní jaderné translokace po zánětlivých stimulech se autoři domnívají, že N-terminální doména má atributy prvku protivirové obrany ve smyslu vrozených imunitních mechanismů (BURYSKOVA et al., 2004).

S transkripčním koaktivátorem p300 a s histonacetyltransferázovým komplexem PCAF přímo interaguje také tumor supresorový protein p53. Tumor supresorový protein p53 je přirozeně se vyskytující protein důležitý pro regulaci buněčného cyklu a diferenciaci buněk. V reakci na genotoxický stres, jakým může být ionizující záření nebo působení UV světla, koordinuje adaptivní odpověď buňky podle jejího aktuálního stavu buď blokádu buněčného cyklu zejména v G2 fázi, nebo pomocí vstupu buňky do procesu programované buněčné smrti, apoptózy. Přesné mechanismy stabilizace p53 nejsou dosud známy, jisté však je, že zahrnují jak přímé interakce s řadou regulačních proteinů, tak posttranslační modifikace (HARRIS a LEVINE, 2005). V důsledku působení UV světla nebo ionizujícího záření dochází pomocí transkripčního koaktivátoru p300 a histonacetyltransferázového komplexu PCAF k acylaci p53, čímž dojde ke zvýšení jeho DNA vazebné schopnosti (LIU et al., 1999). Acetyltransferázy lze obecně zařadit mezi důležité regulátory funkce proteinu p53. Acetylace p53 probíhá na šesti lysinových reziduích C-konce proteinu p53 a je aktivována na základě signálů o buněčném poškození (ITO et al., 2001). Kombinace acetylace lysinů v různých polohách odpovídají reakci na různé stresové podněty, které s sebou nesou odlišný způsob regulace proteinu p53. Acetylovaný protein p53 se tedy může uplatnit například v indukci apoptózy či při zahájení senescence (GU a

ROEDER, 1997; LUO et al., 2000). Oba tyto biologické procesy byly studovány i v souvislosti s interleukinem-1 α (POLLOCK et al., 2003; MARIOTTI et al., 2006) a je otázkou, zda by interakce interleukinu-1 α s histonacetyltransferázami mohla ovlivňovat jejich schopnost modulace aktivity tumor supresorového proteinu p53 a vést např. k indukci apoptózy poškozených buněk (VICENOVA, 2005).

Po ozáření buněk, případně po jejich ošetření médiem z buněk vystavených radiačnímu záření, dochází k paralelnímu zvyšování intracelulárních hladin tumor supresorového proteinu p53 a interleukinu-1 α (ÖSTERREICHER et al., 2003) Vzhledem k prokázanému radioprotektivnímu účinku interleukinu-1 α (PERLSTEIN et al., 1995) by se v případě prokázání jeho kolokalizace dalo hypoteticky uvažovat i o jeho schopnosti reaktivovat nefunkční tumor supresorový protein p53. Z možností shrnutých v souhrnném článku Lane a kol. by v úvahu přicházely možnosti jako vazba inhibující kontakt s MDM2, modifikace zahrnující zvýšení rezistence proteinu tumor supresorového proteinu p53 vůči proteolytické degradaci nebo inhibice nukleárního exportu (LANE et al., 2010).

2.5 Cytokiny z rodiny interleukinu-1 s duální funkcí

Kromě interleukinu-1 α jsou za cytokiny s duální funkcí v rámci rodiny interleukinu-1 považovány interleukin-33 a interleukin-37.

2.5.1 IL-33 (IL-1F11)

Interleukin-33 (IL-1F11) je nejnovější člen rodiny interleukinu-1, který byl původně identifikován jako jaderný faktor („Nuclear Factor from High Endothelium Venules“; NF-HEV). Je trvale a hojně přítomný v buňkách endotelu lymfatických orgánů. V jeho N-terminální oblasti se nachází jaderný lokalizační signál a DNA vazebný motiv „homeodomain-like helix-turn-helix“ (BAEKKEVOLD et al., 2003; CARRIERE et al., 2007). Trvale vysoká exprese

interleukinu-33 je typická pro buňky endotelu cév a pro buňky epitelů tkání, které jsou ve styku s exogenními antigeny (MOUSSION et al., 2008). Z buněk imunitního systému byla exprese tohoto interleukinu prokázána u aktivovaných dendritických buněk, makrofágů a T_H2 lymfocytů (SCHMITZ et al., 2005). Interleukin-33 má kardioprotektivní účinek, je produkován srdečními fibroblasty a v omezené míře také kardiomyocyty (SANADA et al., 2007).

I když se ve struktuře interleukinu-33 vyskytují místa štěpitelná kaspázou-1, tento interleukin nevyžaduje maturaci formou štěpení a je biologicky aktivní jako prekurzor. Naopak štěpením kaspázou-1 *in vivo* v místě, které je substrátem také pro pro-apoptotickou kaspázou-3, dochází k inaktivaci interleukinu-33. Podstatou inaktivace interleukinu-33 pro-apoptotickými kaspázami může být prevence zánětlivé reakce, která by mohla být spuštěna přítomností extracelulárního interleukinu-33. (CAYROL a GIRARD, 2009).

Endogenní interleukin-33 je akumulován v jádře, v oblastech heterochromatinu, a působí jako represor transkripce (CARRIERE et al., 2007). V jiných kompartmentech epiteliálních a endoteliálních buněk nebyl *in vivo* detekován (MOUSSION et al., 2008). Vysoká hladina exprese interleukinu-33 v endoteliálních buňkách, která se pojí s jejich klidovým stavem, po zánětlivé stimulaci vymizí a následné rozvolnění chromatinové struktury umožní snazší transkripci (KUCHLER et al., 2008). K vazbě interleukinu-33 na chromatin dochází v místě acidické kapsy vytvořené konformací dimeru histonů H2A-H2B na povrchu nukleozomu (ROUSSEL et al., 2008). Acidická kapsa je místem interakce dimeru histonů H2A-H2B s histonem H4 a vede k formování chromatinu do vyšších organizačních struktur, které je spojováno s represí transkripce (ZHOU et al., 2007).

2.5.2 IL-37 (IL-1F7)

Interleukin-37 (IL-37/IL-1F7) je jediným členem rodiny interleukinu-1, který má podle dostupných informací protizánětlivé účinky (NOLD et al., 2010)

V lidském organismu nalézáme 5 sestřihových variant IL-37, označovaných IL-1F7a – e, s různou tkáňovou specificitou. Tkáňově specifická regulace sestřihu mRNA IL-37 naznačuje možné rozdíly v regulačních nebo funkčních schopnostech jednotlivých izoform (TAYLOR et al., 2002). Indukovat produkci IL-37 je možné v mononukleárních buňkách periferní krve a v dendritických buňkách (PAN et al., 2001).

S prozánětlivým interleukinem-18 sdílí IL-37b izoforma dvě kritické aminokyseliny podstatné pro vazbu jak k α -řetězci receptoru pro interleukin-18, tak k solubilnímu vazebnému proteinu interleukinu-18 (IL-18BP, „interleukin-18 binding protein“), který účinky interleukinu-18 neutralizuje. Na α -řetězec receptoru pro interleukin-18 (IL-18R α) se váže prekurzor i maturovaný IL-37b. Nejsou ale antagonisty receptoru a ani nespouští signální transdukci. Extracelulární IL-37b vazbou na IL-18BP zvyšuje jeho neutralizační kapacitu ve vztahu k interleukinu-18 a jeho schopnosti indukovat tvorbu IFN- γ (BUFLER et al., 2002).

V klidovém stavu je IL-37b lokalizován v cytoplazmě i v jádře buněk ve velmi nízkých koncentracích (BUFLER et al., 2004; SHARMA et al., 2008). Nízké koncentrace jsou způsobeny rychlou degradací mRNA IL-37b v neaktivovaných buňkách. V této mRNA je obsažena sekvence homologická s tzv. regionem nestability, vyskytující se např. u protoonkogenu c-Myc nebo u VEGF („Vascular Endothelial Growth Factor“). Jedná se o A bohaté místo podél kódující oblasti. Přesná funkce a mechanismus nejsou známy. Stimulace buněk pomocí LPS vede ke stabilizaci mRNA IL-37b a zvýšení koncentrace proteinu v buňkách (BUFLER et al., 2004).

Aktivace buněk pomocí LPS způsobí, kromě popsaného zvýšení koncentrace IL-37b, jeho maturaci proteolytickým štěpením kaspázou-1 a následnou jadernou translokaci maturovaného IL-37b. Maturovaný IL-37b se do jádra dostává pravděpodobně aktivním způsobem (SHARMA et al., 2008).

V jádře aktivovaných buněk byla prokázána interakce IL-37b s transkripčním faktorem Smad3, který je považován za efektorovou intracelulární molekulu TGF- β signalizace. Smad3 spolu vytváří funkční komplex, jehož výsledkem je inhibice tvorby prozánětlivých interleukinů. Sám aktivovaný prozánětlivými faktory např. ligandy Toll Like Receptorů (TLR) se tak IL-37b jeví jako zprostředkovatel negativní zpětné vazby zánětlivé reakce (NOLD et al., 2010).

3 Materiál a metody

3.1 Vybavení

Bloček na mikrozkušavky DB3 (Techne)
Bloček na mikrozkušavky (Major Science)
Bürkerova komůrka (Meopta)
Centrifuga 5415 (Eppendorf)
Centrifuga 5415D (Eppendorf)
Centrifuga Biofuge 15 (Heraeus)
Centrifuga EBA 12R (Hettich Zentrifugen)
Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus)
Centrifuga Micromax (IEC)
Centrifuga Rotina 48R (Hettich Zentrifugen)
Elektroforetický zdroj Power Pac 200 (BIO-RAD)
Elektroforetický zdroj OSP-250L-HV (Owl Separation System)
Elektroporační zařízení Gene Pulser Xcell™ (BIO-RAD)
Fluorescenční mikroskop (Axiovert 40CFL Zeiss; Olympus Cell-R)
Humidifikovaný CO₂ inkubátor (37 °C, 5 % CO₂) (Saynyo)
Jamkové kultivační desky (Nunc)
Jednorázové zkumavky 10-50 ml (TPP)
Jednorázové mikrozkušavky (Eppendorf)
Kryogenní box s dusíkem (Termo Scientific)
Kultivační misky (TPP; Nunc)
Kultivační misky se sklíčkem (In Vitro Scientific - dodává Bio-Port)
Laminární sterilní box (Esco Class II BSC)
Milli-Q plus zařízení na úpravu vody (Millipore)
Mikroskopická sklíčka (Meopta)
PCR cykler Mini Cyclor (MJ Research)
PCR cykler C1000 Thermal cyclor (BIO-RAD)
PCR cykler Mastercycler gradient (Eppendorf)
PCR cykler Mastercycler egradient S (Eppendorf)

Spektrofotometr ND-1000 (NanoDrop)
Stěrky na tkáňové kultury (Orange Scientific)
Světelný mikroskop (Zeiss)
Termobox LBT 165 (Zanussi)
Termobox LBT 168 (Zanussi)
Termoshaker TS-100 (Biosan)
Transluminátor (Vilber Lourmat)
Třepačka Gallenkamp (Scholler Instruments)
Třepačka GFL 1083 (Thermolab)
Třepačka GFL 1086 (Thermolab)
UV Crosslinker (Stratagene Crosslinker 1800)
Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Zamrazovací blok „Mr. Frosty“ (Nalgene)
Zamrazovací mikrozkuřavky (Nalgene)

3.2 Materiál

3.2.1 Chemikálie

Agar (Serva, Sigma)
Agaróza (Invitrogen, Serva)
Antibiotika: ampicilin (Sigma, Spofa)
kanamycin (Spofa)
obecná antibiotika a antimykotika pro tkáňové kultury (Gibco)
BSA (bovinní sérum albumin) (Serva, Sigma)
DAPI (4,6-diamino-2-fenylindol) (Sigma)
Demineralizovaná voda (ddH₂O)
DME (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Sigma)
DMSO (dimethylsulfoxid)
dNTP (Fermentas, Roche)
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (Serva)
Enzymy: Restrikční endonukleázy 10 U/μl (Fermentas)
Ribonuclease A (Fermentas)

Taq polymeráza 5 U/μl (Roche, Fermentas)
T4 DNA ligáza 5 U/μl (Roche, Fermentas)
Trypsin-EDTA (Invitrogen, Sigma)
Ethidium bromid (Sigma)
Ethanol (Lachema)
FBS (fetální bovinní sérum) (Gibco)
Fenol (MERCK)
Fibronektin (Sigma)
Formaldehyd (Sigma)
Glycerol (Lachema)
Glukóza (Serva)
Chloroform (Lachema)
Izoamylalkohol (Lachema)
Izopropanol (Penta)
Kyselina octová (Lachema)
Lysozym 500 U/mg (Serva)
L-glutamin (Sigma Aldriche)
Octan sodný (Sigma)
Paraformaldehyd (Serva)
Roscovitin 6-benzylamino-2(R)-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurin) (Cyclacel) (poskytnut laboratoří RNDr. Bořivoje Vojtěška, DrSc.)
PBS (Invitrogen)
Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) (Serva)
Triton X-100 (Serva)
Tween 20 (Sigma)
Želatina (Sigma Aldrich)

3.2.2 Soupravy pro manipulaci s DNA

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
FastBack DNA Minispin Kit (Renogen Biolab)
Wizard™ Minipreps purification system (Promega)
XNAPS Plasmid Endofree Flexspin Kit (Renogen Biolab)

3.2.3 Roztoky

- KAc 3 M: 60 ml 5 M KAc; 11,5 ml ledová kyselina octová; 28,5 ml ddH₂O
(Roztok III)
- PBS 10×: 80 g NaCl; 2 g KCl; 26,8 g Na₂HPO₄·7H₂O; 2,4 g KH₂PO₄; 800 ml
ddH₂O; pufováno na pH 7,4; doplněno ddH₂O do 1 l
- Roztok II: 1% SDS; 0,2 M NaOH
- STET: 10% sacharóza; 50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA-NaOH (pH
8); 1% Triton X – 100
- TAE 50×: 242 g Tris; 57,1 ml kyselina octová; 100 ml 0,5 M EDTA-NaOH
(pH 8); doplněno ddH₂O do 1 l
- TE: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA-NaOH (pH 8)
- TEG: 25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA-NaOH (pH 8)
(Roztok I)
- TRN: Ribonuclease A (Fermentas) 110 mg/ml; 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5;
0,045 mM NaCl
- Vzorkový pufr 6x (agarózová elektroforéza):
0,09% bromfenolová modř; 0,09% xylen cyanol; 60% glycerol; 60
mM EDTA (Fermentas)
- Pozn.: % jsou uváděna v % (hmotnost/objem); pokud není uvedeno jinak, jedná se
o roztoky vodné

3.2.4 Biologický materiál

3.2.4.1 Bakterie

Escherichia coli XL-1 Blue: F' proABC *lacIq* λ (*lacZ*)M15 *Tn10*(Tetr) / *recA1*
endA1 gyrA96(NaI^r) *thi1 hsdR17*(rk-mk⁺) *supE44 relA1 lac* (Stratagene)

3.2.4.2 Savčí buněčné kultury

- Mrc-5 (ATCC CCL-171): adherentní sekundární nenádorová buněčná linie
zdravých diploidních lidských fetálních plicních fibroblastů s omezeným
počtem dělení přibližně 50×.

- HEK 293T (ATCC CRL-11268): buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinných epitelálních buněk, transformovaná adenovirovým E1A a LT genem viru SV-40.

3.2.5 Kultivační média

3.2.5.1 Kultivace bakteriálních kmenů

Média jsou připravována laborantkou paní Vlastou Pelechovou.

Tekutá média

2×TY: 1,6% pepton; 1% kvasničný autolyzát; 0,5% NaCl; upravit pomocí NaOH na pH 7, podle potřeby přidat antibiotika

Agarové půdy

2×TY: tekuté TY médium; 2% agar, podle potřeby přidat antibiotika

Podle potřeby přidáme antibiotika:

Ampicilin 100mg/ml; Kanamycin 50mg/ml

3.2.5.2 Kultivace savčích buněk

Kompletní kultivační médium

Kompletní kultivační médium připravujeme z následujících komponent:

DME bez fenolového barviva

10% inaktivované fetální hovězí sérum (FBS)

0,5% L-glutamin

V případě potřeby, a pokud se tím nenaruší kultivační podmínky dané kultury, můžeme přidat obecná antibiotika:

0,5% penicilin; 0,5% streptomycin

Další roztoky používané při kultivaci savčích buněk

0,25% Trypsin-EDTA: 2,5 g/l trypsin, 0,38 g/l kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

PBS

Fibronektin

3.2.6 Transfekční média

Opti-MEM (Gibco, Invitrogen)

3.2.7 Transfekční reagensie

ExGen 500 (Fermentas)

JetPEI (Polyplus)

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

TurboFect (Fermentas)

3.2.8 Protilátky

Primární protilátka: monoklonální myší protilátka specifická pro p53 (Chemicon)

Sekundární protilátka: anti-mouse konjugovaná s Alexa Red 594 (Invitrogen)

3.2.9 Roztoky používané pro přípravu preparátů na mikroskopii

Blokovací roztok (0,25% želatina, 0,25% BSA v PBS)

DAPI (40 µl/ml v 50% ethanolu)

Mounting médium (Invitrogen)

Paraformaldehyd (3% v PBS)

Roscovitin 20µM roztok v kompletním kultivačním médiu

Triton X 0,5%

Tween 0,05%

3.2.10 Vektory

pEGFP-C1 (Clontech)

MigR1 (poskytnut laboratoří Warrena Peara, Philadelphia)

3.2.11 Primery (Generi Biotech)

pEGFP-C1 sekvenační primer: 5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'

MSCV sekvenační primer: 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC-3'

NTP reverse primer: 5'-GGCTTGATGATTTCTTCCTCTGAGTC-3'

3.2.12 DNA modifikující enzymy

BamHI (Fermentas)

BglII (Fermentas)

NdeI (Fermentas)

SalI (Fermentas)

XhoI (Fermentas)

3.2.13 Pufry pro restrikční endonukleázy, DNA polymerázy a T4 DNA ligázu

„Green“ restrikční pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 při 37°C); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0.1 mg/ml BSA (Fermentas)

„Orange“ restrikční pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 při 37°C); 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl; 0,1 mg/ml BSA (Fermentas)

„Red“ restrikční pufr: 10 mM Tris HCl (pH 8.5 at 37°C); 10 mM MgCl₂; 100 mM; KCl; 0.1 mg/ml BSA (Fermentas)

„Yellow“ restrikční pufr: 33 mM Tris-octan (pH 7,9 při 37°C), 10mM octan hořečnatý, 66 mM octan draselný, 0,1 mg/ml hovězí sérový albumin (BSA) (Fermentas)

Taq PCR pufr: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C); 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40; 15 mM MgCl₂ (Fermentas)

T4 DNA ligační pufr: 40 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP (pH 7.8 při 25°C) (Fermentas)

3.2.14 Standardy velikostí a množství DNA

λDNA / Eco91I[BstEII] Marker 15 (Fermentas): 117-8453 bp

λDNA / Eco130I[StyI] Marker 16 (Fermentas): 74-19329 bp

O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas): 100-3000 bp

O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas): 50-1000 bp

3.3 Metody

3.3.1 Práce s DNA

3.3.1.1 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

- Množství agarózy, odpovídající výsledné koncentraci, udávané v procentech, rozpustíme zahříváním v 1×TAE pufru.
- Rozpuštěnou agarózu zchladíme na 60°C.
- Vychladlou agarózu nalijeme do připravené vaničky, přidáme ethidium bromid (výsledná koncentrace 0,175 µg/ml), zasuneme hřeben a necháme ztuhnout.
- Po ztuhnutí gelu vysuneme hřeben, vaničku s gelem umístíme do elektroforetického přístroje a přelijeme 1×TAE puftrem.
- Ke vzorkům přidáme vzorkový pufr (cca 1/5 objemu vzorků) a nanese je do jamek v gelu.
- Zapojíme zdroj napětí 5 V/cm na cca 1 hodinu.
- Gel fotografujeme v procházejícím ultrafialovém (UV) záření (300-310 nm).
- Snímky exponujeme 1-4 sekundy digitálním fotoaparátem (Samsung EX1).

3.3.1.2 Minipreparace plazmidové DNA z bakteriálních buněk *E. coli*

- Vybrané klony *E. coli* přečárkujeme na plotnu se selekčním médiem (požadovaným antibiotikem), na plochu cca 2×2 cm a inkubujeme při

37°C 12-18 hodin (delší inkubace má za následek snížení výtěžku plazmidů).

- Do 1,5 ml polypropylénové mikrozkuřavky napipetujeme 400 µl STET pufru, narostlé bakterie opatrně stáhneme sterilním párátkem a dokonale je v pufru resuspendujeme.
- Přidáme 5 µl 5% lysozymu, důkladně promícháme a inkubujeme 2 minuty při 95°C.
- Necháme krátce vychladnout a centrifugujeme 5-10 minut při 15000×g při laboratorní teplotě.
- Tupou stranou párátko opatrně odstraníme pelet
- K supernatantu přidáme stejné množství izopropanolu (1 objem) a inkubujeme minimálně 30 minut, lépe 60 minut při -20°C.
- Centrifugujeme 30 minut při 15000×g při laboratorní teplotě.
- Odstraníme supernatant a sediment promyjeme 1 ml 70% ethanolu.
- Centrifugujeme 10 minut při 15000×g při laboratorní teplotě.
- Sediment necháme dokonale vysušit při laboratorní teplotě, případně v bloku zahřátém na 37°C.
- Vysušený sediment resuspendujeme ve 20-30 µl TE pufru nebo v TRN pufru.

3.3.1.3 Midipreparace plazmidů z *E. coli*

- Kulturu *E. coli* nesoucí daný plazmid aerobně kultivujeme na třepačce přes noc při 37°C v 50 ml média s příslušným antibiotikem.
- Centrifugujeme 10 minut při 15000×g.
- Sediment řádně resuspendujeme ve 2 ml roztoku TEG (roztok I) a přidáme 4 ml roztoku II, opatrně promícháme a inkubujeme 5 minut při laboratorní teplotě.
- Přidáme 3 ml roztoku 3 M KAc (roztok III), opatrně promícháme a inkubujeme 20 minut při -20°C.
- Centrifugujeme 30 minut při 4°C a 15000×g.
- Supernatant přefiltrujeme přes gázu a přidáme k němu 0,7 objemu izopropanolu.

- Inkubujeme 10 minut při -20°C .
- Centrifugujeme 30 minut při 4°C a $15000\times g$.
- Sediment promyjeme 3 ml 70% ethanolu a necháme vyschnout při laboratorní teplotě.
- Sediment resuspendujeme ve 400 μl TE pufru, přidáme 3 μl TRN a inkubujeme 1 hodinu při 37°C .
- Roztok extrahujeme 1 objemem fenolu a 1 objemem směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol v poměru 25:24:1 (opakujeme, dokud nezmizí mezifáze tvořená vysráženými zbytky proteinů).
- Roztok extrahujeme 1 objemem směsi chloroform:izoamylalkohol v poměru 24:1.
- K supernatantu přidáme 0,1 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 objemu 98% ethanolu vychlazeného na -20°C a inkubujeme minimálně 1 hodinu při -20°C .
- Vysráženou DNA sedimentujeme 10 minut při maximálních otáčkách, sediment promyjeme 1 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20°C a dokonale vysušíme.
- Vysušený sediment rozpustíme ve 300 μl TE pufru.

3.3.1.4 Srážení DNA v ethanolu

- Na jeden objem roztoku DNA přidáme 3 objemy vychlazeného 96% ethanolu a 0,1 celkového objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2).
- Promícháme vortexováním.
- Necháme srážet 2 hodiny na -20°C .
- Vysráženou DNA centrifugujeme 30 minut při $13\ 000\times g$ a 4°C .
- Sediment promyjeme 70% vychlazeným ethanolem, 5 minut centrifugujeme při $13\ 000\times g$ a 4°C .
- Sediment vysušíme při laboratorní teplotě.
- Sediment rozpustíme v optimálním množství TE pufru.

3.3.1.5 Minipreparace plazmidů z bakteriálních buněk *E. coli* pomocí soupravy Wizard (Promega)

Plazmidovou DNA izolujeme podle návodu příloženého výrobcem.

3.3.1.6 Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk *E. coli* pomocí soupravy XNAPS Plasmid Endofree Flexspin Kit (Renogen Biolab)

Pomocí soupravy XNAPS Plasmid Endofree Flexspin Kit (Renogen Biolab) izolujeme plazmidy pro použití v tkáňových kulturách. Souprava obsahuje reagensii EndoOut Solution EOS, pomocí které dojde k odstranění endotoxinu. Postupujeme podle návodu výrobce.

3.3.1.7 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

DNA štěpíme pomocí restrikčních endonukleáz ve specifických restrikčních pufrech doporučených výrobcem (Fermentas). V závislosti na struktuře a čistotě vzorku DNA použijeme 1-10 U enzymu/ μg DNA. Inkubujeme 1-4 hodiny při výrobce doporučené optimální teplotě štěpení. Reakci zastavíme ochlazením směsi na -20°C . Množství a kvalitu štěpené DNA ověříme pomocí agarózové elektroforézy.

3.3.1.8 Izolace DNA z gelu

Fragmenty DNA z agarózového gelu vhodné koncentrace izolujeme pomocí soupravy FastBack DNA Minispin Kit (Renogen Biolab). Postupujeme podle návodu výrobce.

- Na transluminátoru čistým skalpelem vyřízneme část gelu s požadovaným fragmentem DNA, přeneseme jej do mikrozkuřavky a zvážíme.
- Přidáme minimálně trojnásobek hmotnosti gelu rozpouštěcího roztoku a zahříváme při 60°C 5-10 minut (100 mg gelu přibližně odpovídá 100 μl roztoku).

- Suspenzi přepipetujeme do kolonky s fritou a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách.
- Fritu s navázanou DNA promyjeme 750 μ l promývacího roztoku a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách.
- Opakujeme promývací krok s 250 μ l promývacího roztoku a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách.
- Na kolonu s fritou přidáme 20-30 μ l ddH₂O a centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách.

3.3.1.9 Ligace DNA v roztoku

Ligaci provádíme enzymem T4 DNA ligáza.

Složení ligační směsi (celkový objem 10 μ l):

1 μ l 10 \times koncentrovaný ligační pufr
 1 μ l T4 DNA ligáza
 DNA vektor a inzert ve vhodně zvoleném poměru
 ddH₂O do objemu 10 μ l

- Ligační směs inkubujeme 2-4 hodiny při laboratorní teplotě.
- Ligační směs inkubujeme 16 hodin při teplotě 16°C.
- Ligační směs inkubujeme 24 hodin při teplotě 4°C.
- Ligační směs použijeme k transformaci *E. coli* vhodného kmene, případně uchováme při -20°C.

3.3.1.10 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na mikrokapilárním spektrofotometru ND-1000 v objemu 1-2 μ l.

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.2.1 PCR pro ověření vložení fragmentu N-terminální domény do rekombinantního vektoru

Pomocí PCR reakce byla amplifikována oblast inzertu, která byla následně podrobena analýze pomocí agarózové elektroforézy.

Složení PCR reakční směsi (celkový objem 20 μ l):

15 μ l ddH₂O

2 µl 10x PCR pufr s Mg²⁺
0,5 µl dNTP (1.25 mM)
0,5 µl primer forward (5 µM)
0,5 µl primer reverse (5 µM)
1 µl DNA templát (10 ng templátové DNA)
0,5 µl Taq polymeráza (1 U/µl)

Použité primery:

pEGFP-C1 sekvenační primer:
5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
NTP reverse primer:
5'-GGCTTGATGATTTCTTCCTCTGAGTC-3'

Templátová DNA:

rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP

PCR probíhalo podle následujícího programu:

1.	95°C	3 minuty
2.	95°C	30 sekund
3.	65°C	30 sekund
4.	72°C	30 sekund
5.	vrátit ke kroku 2	opakovat 30×
6.	72°C	5 minut
7.	4°C	do odvolání

3.3.2.2 PCR pro sekvenování inzertu v rekombinantním vektoru pEGFP-C1/NTP

Pomocí PCR byla amplifikována oblast inzertu, která byla posléze osekvenována.

Složení PCR reakční směsi (celkový objem 20µl):

11,5 µl ddH₂O
4 µl 5x sekvenční pufr (souprava BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)
0.5 µl primer (5pmol)
2 µl templát (500-600 ng DNA)
2 µl sekvenační směs (souprava BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)

Použité primery:

pEGFP-C1 sekvenační primer:
5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
NTP reverse primer:
5'-GGCTTGATGATTTCTTCCTCTGAGTC-3'

Templátová DNA: rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP

PCR probíhalo podle následujícího programu:

- | | | |
|----|--------------------|--------------|
| 1. | 4°C | do odvolání |
| 2. | 96°C | 1 minuta |
| 3. | 96°C | 30 sekund |
| 4. | 58°C | 30 sekund |
| 5. | 60°C | 4 minuty |
| 6. | vrátit ke kroku 3. | opakovat 24× |
| 7. | 4°C | do odvolání |

Po dokončení programu byla reakční směs vyčištěna srážením v 96% ethanolu.

Vysušená DNA byla předána k sekvenační analýze do Laboratoře sekvence DNA, PřF UK.

3.3.2.3 PCR pro sekvenování inzertu v rekombinantním vektoru MigR1/NTP

Pomocí PCR byla amplifikována oblast inzertu, která byla posléze osekvenována.

Složení PCR reakční směsi (celkový objem 20µl):

- 11,5 µl ddH₂O
- 4 µl 5x sekvenční pufr (souprava BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)
- 0.5 µl primer (5pmol)
- 2 µl templát (500-600 ng DNA)
- 2 µl sekvenační směs (souprava BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)

Použité primery:

MSCV sekvenční primer:

5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3'

NTP reverse primer:

5'-GGCTTGATGATTTCTTCCTCTGAGTC-3'

Templátová DNA: rekombinantní vektor MigR1/NTP

PCR probíhalo podle následujícího programu:

- | | | |
|----|------|-------------|
| 1. | 4°C | do odvolání |
| 2. | 96°C | 1 minut |
| 3. | 96°C | 30 sekund |
| 4. | 58°C | 30 sekund |
| 5. | 60°C | 4 minut |

- | | |
|-----------------------|--------------|
| 6. vrátit ke kroku 3. | opakovat 24× |
| 7. 4°C | do odvolání |

Po dokončení programu byla reakční směs vyčištěna srážením v 96% ethanolu.

Vysušená DNA byla předána k sekvenční analýze do Laboratoře sekvence DNA, PřF UK.

3.3.3 Práce s bakteriemi

3.3.3.1 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Elektrokompetentní buňky byly připraveny laborantkou paní Vlastou Pelechovou

- Zaočkujeme exponenciálně rostoucí kulturu požadovaného kmene do 50 ml 2×TY média (vytemperovaného na 37°C) na $OD_{600nm} = 0,1$.
- Aerobně kultivujeme při 37°C do dosažení $OD_{600nm} = 0,7 - 0,9$.
- Centrifugujeme 10 minut při 2800×g a laboratorní teplotě, odstraníme supernatant, od ukončení centrifugace vždy důsledně chladíme na ledu.
- Pelet resuspendujeme v 50 ml ddH₂O vychlazené na 4°C, centrifugujeme 10 minut při 2800×g a 4°C, odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 25 ml ddH₂O vychlazené na 4°C, centrifugujeme 10 minut při 2800×g a 4°C, odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 20 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4°C, centrifugujeme 10 minut při 2800×g a 4°C, odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 10 ml 10% glycerolu vychlazeného na 4°C, centrifugujeme 10 minut při 2800×g a 4°C, odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 1ml 10% glycerolu vychlazeného na 4°C.
- Buňky uchováváme při -70°C.

3.3.3.2 Transformace buněk *Escherichia coli* elektroporací

- Ve vychlazené elektroporační kyvetě se vzdáleností elektrod 2 mm smícháme 50 µl rozmrazené suspenze elektrokompetentních bakterií *E. coli* (kmen *XL 1 blue*, uchovávané v -70°C) a DNA v množství cca 100 ng.

- Osušenou elektroporační kyvetu vložíme do generátoru pulsu (Biorad).
- Po nastavení těchto hodnot: kapacitance 25 μ F, napětí 2,5 kV, odpor 200 Ω aplikujeme puls.
- Okamžitě přidáme 0,6-2 ml 2 \times TY média temperovaného na 37°C bez antibiotik.
- Inkubujeme 1 hodinu při 37°C na třepačce.
- Vysejeme na misky s příslušným antibiotikem.
- Inkubujeme dnem vzhůru v termostatu při 37°C přes noc.

3.3.3.3 Skladování bakteriálních kmenů

Krátkodobě (několik týdnů až měsíců) uchováváme bakteriální kmeny na agarových plotnách při teplotě 4°C. Dlouhodobě bakteriální kmeny nesoucí rekombinantní vektor uchováváme při teplotě -70°C v suspenzi sterilního glycerolu, jehož výsledná koncentrace je 25%.

3.3.4 Práce s buněčnými kulturami

3.3.4.1 Pasážování adherentní savčí buněčné kultury

Buňky standardně kultivujeme v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené 5% CO₂ s relativní vlhkostí kolem 90%. Kultivace probíhá v jednorázových kultivačních miskách určených pro tkáňové kultury (Ø60 mm nebo Ø100 mm). Používáme médium DME bez fenolového barviva s přidavkem 10% inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS), obohacené o L-glutamin. Na malé misce (Ø60 mm) kultivujeme buňky ve 4-5 ml kompletního média, na velké misce (Ø100 mm) v 10 ml kompletního média. Stav buněčné kultury pravidelně kontrolujeme pod mikroskopem. Při dosažení konfluence - vytvoření souvislé vrstvy buněk, které se vzájemně dotýkají - přistoupíme k tzv. pasážování, vytvoříme subkultury. Adherentní buňky uvolníme od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, naředíme a přeneseme je do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. Buňky pasážujeme v poměru 1:2 až 1:4, 1 až 2 krát týdně v závislosti na jejich konfluenci. Práci s tkáňovými kulturami provádíme ve sterilním boxu.

3.3.4.2 Pasážování adherentní savčí buněčné kultury působením Trypsin-EDTA

- Dáme temperovat kultivační medium a roztok 0,05% Trypsin-EDTA.
- Odsajeme stávající médium.
- Buňky opláchneme PBS, tím odstraníme zbytky média, které obsahuje inhibitory trypsinu.
- Aplikujeme roztok Trypsin-EDTA (1/10 používaného objemu kultivačního média).
- Necháme působit 4-6 minut při 37°C a 5% CO₂, dokud se buňky neoddělí ode dna misky.
- Doplníme čerstvé kompletní médium (9/10 používaného objemu kultivačního média, tím také dojde k inaktivaci trypsinu) a buněčné agregáty resuspendujeme pomocí pipety.
- Na novou misku přeneseme požadovaný objem buněčné suspenze, doplníme čerstvým kompletním médiem a resuspendujeme.
- Misky s kulturou vložíme do termostatu.

3.3.4.3 Pasážování adherentní savčí buněčné kultury mechanickou disociací

- Dáme temperovat kultivační medium.
- Odsajeme stávající médium.
- Přidáme čerstvé kompletní médium.
- Buňky mechanicky oddělíme ode dna kultivační misky pomocí stěrky.
- Buněčné agregáty důkladně resuspendujeme pomocí pipety.
- Na novou misku přeneseme požadovaný objem buněčné suspenze, doplníme čerstvým kompletním médiem a resuspendujeme.
- Misky s kulturou vložíme do termostatu.

3.3.4.4 Počítání buněk

Ruční počítání buněk provádíme pomocí kalibrované Bürkerovy komůrky. Jedná se o přímou metodu stanovení počtu buněk. Počítání provádíme v políčkách, která jsou patrná pod mikroskopem a mají definovanou velikost. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci oddělenými trojitou čarou, každý má plochu 1 mm². Ty jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců, jejichž plocha je 0,04 mm².

Počítáme nejprve 5 velkých čtverců 1×1 mm v jedné polovině komůrky. Je-li celkový počet buněk menší než 100, počítáme buňky i v dalších 5 čtvercích ve druhé polovině komůrky. Za hranici čtverce považujeme prostřední linku z trojitě čáry. Abychom buňky ležící na hranici dvou čtverců nezapočítali dvakrát, z buněk, které leží na okraji čtverce, se počítají ty, které se i jen dotýkají levého nebo horního okraje, a naopak se nepočítají buňky, které se i jen dotýkají pravého nebo dolního okraje.

Naneseme malé množství buněčné suspenze na počítací síť Bürkerovy komůrky a přiklopíme krycím sklíčkem.

Bürkerovu komůrku vložíme pod světelný mikroskop a spočítáme buňky dle výše popsaných pravidel.

Počet buněk vypočítáme podle vzorce

$$P = (N \times D \times 1000) / (H \times S)$$

kde P je počet buněk na 1 ml suspenze

N je celkový počet napočítaných buněk

D = ředění suspenze

H = 0,1 (hloubka komůrky v mm)

S je počet započítaných čtverců

3.3.5 Transfekce savčích buněčných linií

3.3.5.1 Izolace plazmidů pro použití v tkáňových kulturách

Plazmidy určené k transfekci buněčné kultury izolujeme pomocí soupravy XNAPS Plasmid Endofree Flexspin Kit, semisterilně, včetně kroků odstraňujících endotoxin. Kvantitu a kvalitu plazmidové DNA (OD_{250}/OD_{280} 1,8 a více) měříme spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.

3.3.5.2 Příprava buněk před transfekcí

Přípravné práce a vlastní transfekci buněk provádíme ve sterilním boxu.

- Do kultivační nádoby vložíme krycí mikroskopická sklíčka omytá ethanolem a třikrát opláchnutá PBS.
- Na sklíčka aplikujeme buněčnou suspenzi předem vyzkoušené koncentrace.
- Buňky necháme 24 hodin kultivovat.

3.3.5.3 Vlastní transfekce

Byly použity tyto transfekční reagenty:

ExGen 500 (Fermentas)

JetPEI (Polyplus)

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

TurboFect (Fermentas)

Transfekční médium Opti-MEM (Gibco)

Postupujeme podle návodu přiloženého výrobcem. Pokud bylo potřeba přistoupit k optimalizaci některého z kroků, jsou tato fakta i důvody k tomu vedoucí zdůrazněna v kapitole Výsledky.

3.3.5.4 Příprava preparátu s transfekovanými buňkami na fluorescenční mikroskopii

- Buňky fixujeme na krycí sklíčko 3% paraformaldehydem v PBS, 25 minut.
- 3×10 minut promýváme roztokem PBS na kývačce (pokud chceme přidat DAPI, tak do 2. promývání přidáme na druhých 5 minut 5-10μl roztoku DAPI v ethanolu).
- Krycí sklíčko s preparátem smočíme v ddH₂O a necháme osušit.
- Na podložní sklo aplikujeme mounting médium, přibližně 8μl.
- Přiložíme omyté a oschlé krycí sklíčko s preparátem.

3.3.5.5 Příprava imunofluorescenčních preparátů

- Buňky fixujeme na krycí sklíčko 3% paraformaldehydem v PBS, 25 minut.
- Buňky permeabilizujeme 5 minut 0,5% roztokem Triton X.
- Promyjeme 3×10 minut PBS.

- Necháme působit blokovací roztok 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS.
- Přidáme primární protilátku naředěnou v blokovacím roztoku s přídavkem 0,05% Tween a necháme 1 hodinu inkubovat.
- Promyjeme 3×10 minut PBS.
- Přidáme sekundární protilátku naředěnou v blokovacím roztoku a necháme inkubovat 45 minut.
- 3×10 minut promýváme roztokem PBS na kývačce (pokud chceme přidat DAPI, tak do 2. promývání přidáme na druhých 5 minut 5-10 μ l roztoku DAPI v ethanolu).
- Krycí skříčka s preparátem smočíme v ddH₂O a necháme osušit.
- Na podložní sklo aplikujeme mounting médium, přibližně 8 μ l.
- Přiložíme omyté a oschlé krycí skříčko s preparátem.

3.3.5.6 Indukce tumor supresorového proteinu p53 a jeho stabilizace pomocí roscovitinu

K indukci tumor supresorového proteinu p53 použijeme UV záření generované přístrojem UV Crosslinker (Stratagene). K jeho stabilizaci v buňkách použijeme sloučeninu roscovitin.

- Z kultivačních misek s buňkami odsajeme veškeré médium.
- Aplikujeme záření o vybrané hodnotě (např. 20 J/m²).
- K buňkám přidáme médium s roscovitinem o koncentraci 20 μ M.
- Buňky kultivujeme 20 hodin.

3.3.5.7 Kryoprezervace buněčných linií

Kryoprezervací buněčných linií vytvoříme zálohu pro případ, že by došlo ke kontaminaci nebo zničení pěstované kultury. V případě buněčné linie s omezeným počtem dělení se po zestárnutí kultury můžeme vrátit k zmrazené nižší pasáži. Živé buňky zmrazujeme tak, aby nedošlo k jejich poškození krystaly vody. Do kultivačního média proto přidáváme kryoprotektivum dimethylsulfoxid (DMSO). Abychom zlepšili přežívání buněk při zmrazení a rozmrazení, přidáváme do kultivačního média více séra. Nejlepších výsledku dosáhneme, pokud buňky zmrazujeme pomalu, ochlazováním o 1 až 3 °C za minutu ve vhodné izolované

nádobě naplněné nemrznoucím roztokem, který zabezpečí správnou rychlost chladnutí buněčné suspenze. Pro přípravu kryokonzerv z adherentních savčích buněčných linií kultivujeme buňky do cca 90% konfluence. Z jedné malé misky (Ø 60 mm) připravíme jednu kryokonzervu. Při přípravě kryokonzerv pracujeme s buňkami a následně s buněčnou suspenzí ve sterilním boxu.

- Připravíme si zmrazovací médium s 10% DMSO a 20% FBS, na každou zmrazovací mikrozkuhavku 1 ml.
- Buňky stáhneme z povrchu misky stěrkou a resuspendujeme v 5 ml média nebo je trypsinizujeme a doplníme do 5 ml kultivačního média, buněčnou suspenzi přesuneme do plastové zkuhavky a centrifugujeme 5 minut při 80-90×g.
- Odsajeme médium, přidáme k buňkám zmrazovací médium, buňky důkladně resuspendujeme.
- Buněčnou suspenzi rozplníme do 1,5 ml zmrazovacích mikrozkuhovek Nalgene (0,5-1 minutová inkubace-je dodržena během manipulace).
- Zamrazovací mikrozkuhavky vložíme do zmrazovacího bloku „Mr. Frosty“ – nádoby s izopropanolem a celé uložíme do -80°C.
- Druhý den přemístíme zamrazovací mikrozkuhavky do kontejneru s kapalným dusíkem (LN₂).

3.3.5.8 Rozmrazování buněk

Zatímco zamrazení buněčné suspenze provádíme pomalu, rozmrazujeme ji naopak co nejrychleji. Manipulace s vlastní buněčnou suspenzí provádíme ve sterilním boxu.

- Vyjmeme zamrazovací mikrozkuhavku s buňkami z kapalného dusíku (LN₂) a ve vodní lázni temperované na 37°C ji rozehríváme.
- Rozmražené buňky přeneseme do plastové zkuhavky s 5 ml temperovaného kultivačního média, resuspendujeme.
- Centrifugujeme 5 minut při 80-90×g.
- Odpipetujeme médium s DMSO.

- Přidáme potřebné množství (5 ml) nového kompletního kultivačního média.
- Buňky resuspendujeme a přeneseme do kultivační misky.
- Kultivační misku s kulturou vložíme do termostatu a druhý den kulturu zkontrolujeme.

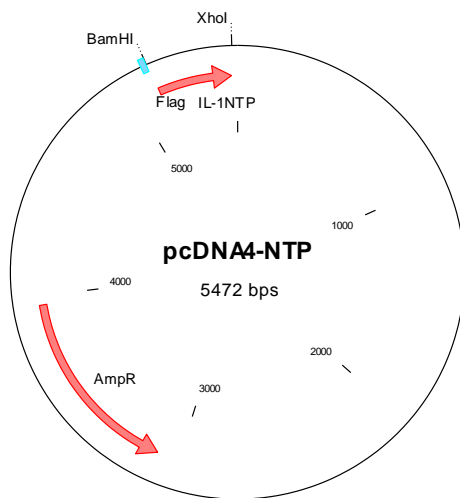
4 Výsledky

4.1 Příprava rekombinantního vektoru pEGFP-C1/NTP

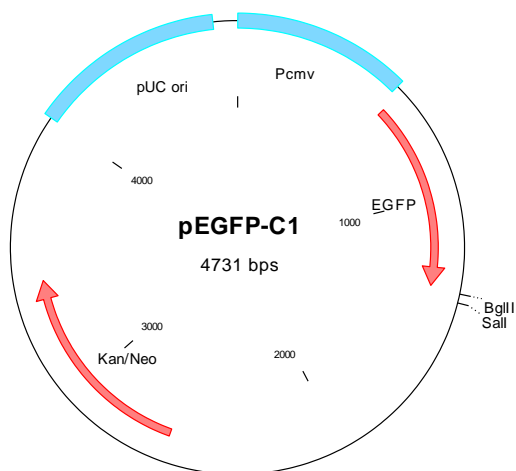
Zkonstruovala jsem rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP pro expresi NTP domény IL-1 α v savčích buněčných kulturách s cílem využít jej pro dílčí projekty v rámci širšího výzkumu zaměřeného na studium jaderné funkce IL-1 α . Úspěšnost vložení DNA kódující NTP doménu IL-1 α do vektoru jsem ověřila štěpením restrikními endonuklézami, pomocí PCR a sekvenováním. Expresi NTP domény IL-1 α a její lokalizaci jsem pozorovala fluorescenčním mikroskopem.

4.1.1 Štěpení plazmidu pcDNA4 NTP a vektoru pEGFP-C1

Pro přípravu rekombinantního vektoru pEGFP-C1/NTP jsem NTP doménu IL-1 α vyštěpila z plazmidu pcDNA4-NTP (obr. 4.1.1.1) pomocí restrikních endonukleáz BamHI a XhoI. Cílový DNA vektor pEGFP-C1 (obr. 4.1.1.2) jsem štěpila kombinací restrikních endonukleáz BglII a SalI. Obě restrikní směsi jsem elektroforeticky rozdělila v 0,5% agarózovém gelu. DNA fragment NTP domény IL-1 α (velikost 328 bp) a prázdný vektor pEGFP-C1 (velikost 4701 bp) jsem z gelu vyřízla skalpelem a izolovala pomocí soupravy Fast Back DNA Mini Spin Kit 100.



Obr. 4.1.1.1 Plazmid pcDNA4-NTP ze kterého byl vyštěpen gen kódující NTP doménu IL-1 α s vyznačenými cílovými místy restričních enzymů použitých ke štěpení.



Obr. 4.1.1.2 Výchozí DNA vektor pEGFP-C1 s vyznačenými cílovými místy restričních enzymů použitých ke štěpení.

4.1.2 Ligace fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru pEGFP-C1

Množství DNA fragmentu NTP domény IL-1 α (velikost 328 bp) a prázdného vektoru pEGFP-C1 (velikost 4701 bp) potřebných k ligační reakci jsem odhadovala z následné agaróзовé elektroforézy. Ligace probíhala přes noc při teplotě 16°C působením T4 DNA ligázy. Plazmid dostal název pEGFP-C1/NTP (obr. 4.1.5.1).

4.1.3 Transformace bakterií ligační směsí fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru pEGFP-C1

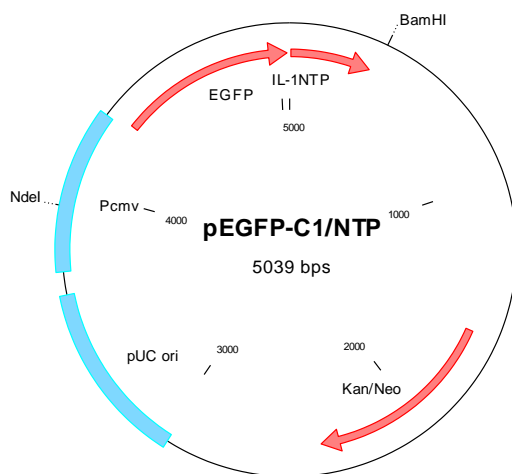
Pomocí elektroporátoru jsem ligační směsí o objemu 4 μ l transformovala 50 μ l suspenze kompetentních bakterií *E. coli* kmene XL-1 Blue. Tři různá množství suspenze transformovaných bakterií jsem vysela na Petriho misky s 2 \times TY agarem obsahujícím kanamycin jako selekční agens a kultivovala přes noc při 37°C. Do druhého dne narostlo mnoho kolonií na všech miskách. Několik náhodně vybraných kolonií jsem přečárkovala na nové Petriho misky s kanamycinem a opět kultivovala přes noc při 37°C. U vybraných kolonií jsem minipreparací vyzolovala plazmidovou DNA.

4.1.4 Ověření vložení NTP domény IL-1 α do vektoru pEGFP-C1/NTP pomocí PCR

K ověření vložení fragmentu NTP domény IL-1 α do plazmidu pomocí PCR jsem zvolila kombinaci NTP reverse primeru a pEGFP-C1 sekvenačního primeru (v roli forward primeru). Vyzolovanou plazmidovou DNA z jednotlivých kolonií narostlých po transformaci ligační směsí jsem 100 \times naředila a 1 μ l naředěné DNA jsem přidala do PCR reakce. Jako negativní kontrolu jsem zvolila prázdný vektor pEGFP-C1 a reakci bez použití templátové DNA. Následná analýza pomocí agaróзовé elektroforézy potvrdila přítomnost inzertu v plazmidu pEGFP-C1/NTP.

4.1.5 Ověření vložení NTP domény IL-1 α do vektoru pEGFP-C1/NTP štěpením restričními endonukleázami

Provedla jsem ověření úspěšnosti vložení NTP domény IL-1 α do vektoru pEGFP-C1/NTP štěpením restričními endonukleázami. Použitím kombinace restričních endonukleáz BamHI a NdeI jsem vyštěpila fragment DNA o velikosti 1464 bp obsahující také sekvenci NTP domény IL-1 α viz obr. 4.1.5.1. V případě prázdného vektoru měl fragment DNA velikost 1156 bp. Rozdíl ve velikosti vyštěpených fragmentů jsem odečetla z agarózové elektroforézy.



Obr. 4.1.5.1 Výsledný konstrukt pEGFP-C1/NTP s vyznačenými cílovými místy restričních enzymů použitých ke štěpení.

4.1.6 Zálhování pozitivních klonů *E. coli* nesoucích plazmid pEGFP-C1/NTP

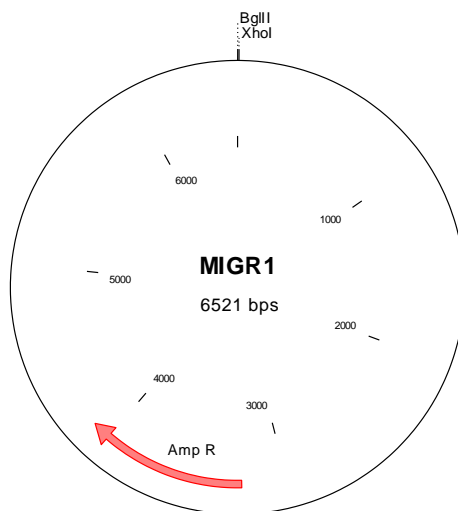
Ověřené klony transformovaných bakterií *E. coli* kmene XL-1 Blue nesoucí rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP jsem dlouhodobě uchovávala v 25% glycerolu při -70°C.

4.2 Příprava rekombinantního vektoru MigR1/NTP

K přípravě rekombinantního vektoru MigR1/NTP jsem přistoupila z důvodu nízké účinnosti transfekce lidské buněčné linie Mrc-5 rekombinantním vektorem pEGFP-C1/NTP pomocí transfekčních reagensů. Rekombinantní vektor MigR1/NTP je určený k enkapsidaci do viru pro virovou transdukcí buněk. V průběhu mé diplomové práce k retrovirové transdukcí buněčné linie Mrc-5 nedošlo. Správnost inserce NTP domény IL-1 α do vektoru jsem ověřila štěpením restričními endonukleázami a sekvenováním. Rekombinantní vektor MigR1/NTP je připraven k dalšímu použití.

4.2.1 Štěpení plazmidu pcDNA4-NTP a vektoru MigR1

Při přípravě rekombinantního vektoru MigR1/NTP jsem NTP doménu IL-1 α vyštěpila z plazmidu pcDNA4-NTP pomocí restričních endonukleáz BamHI a XhoI, tedy stejně jako při přípravě plazmidu pEGFP-C1/NTP (obr. 4.1.1.1). Cílový vektor MigR1 jsem štěpila kombinací restričních endonukleáz XhoI a BglII (obr. 4.2.1.1.). Restriční směsi jsem elektroforeticky rozdělila v 1% agarózovém gelu. DNA fragment NTP domény IL-1 α a prázdný vektor MigR1 jsem z gelu vyřízla a izolovala pomocí soupravy Fast Back DNA Mini Spin Kit 100.



Obr. 4.2.1.1 Výchozí vektor MigR1 s vyznačenými cílovými místy restričních enzymů použitých ke štěpení.

4.2.2 Ligace fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru MigR1

Množství DNA fragmentu NTP domény IL-1 α a prázdného vektoru MigR1 potřebných k ligační reakci jsem odhadovala z agarózové elektroforézy. Ligace probíhala přes noc při teplotě 16°C působením T4 DNA ligázy. Nově připravovaný plazmid jsem pojmenovala MigR1/NTP.

4.2.3 Transformace bakterií ligační směsí fragmentu NTP domény IL-1 α a otevřeného vektoru MigR1

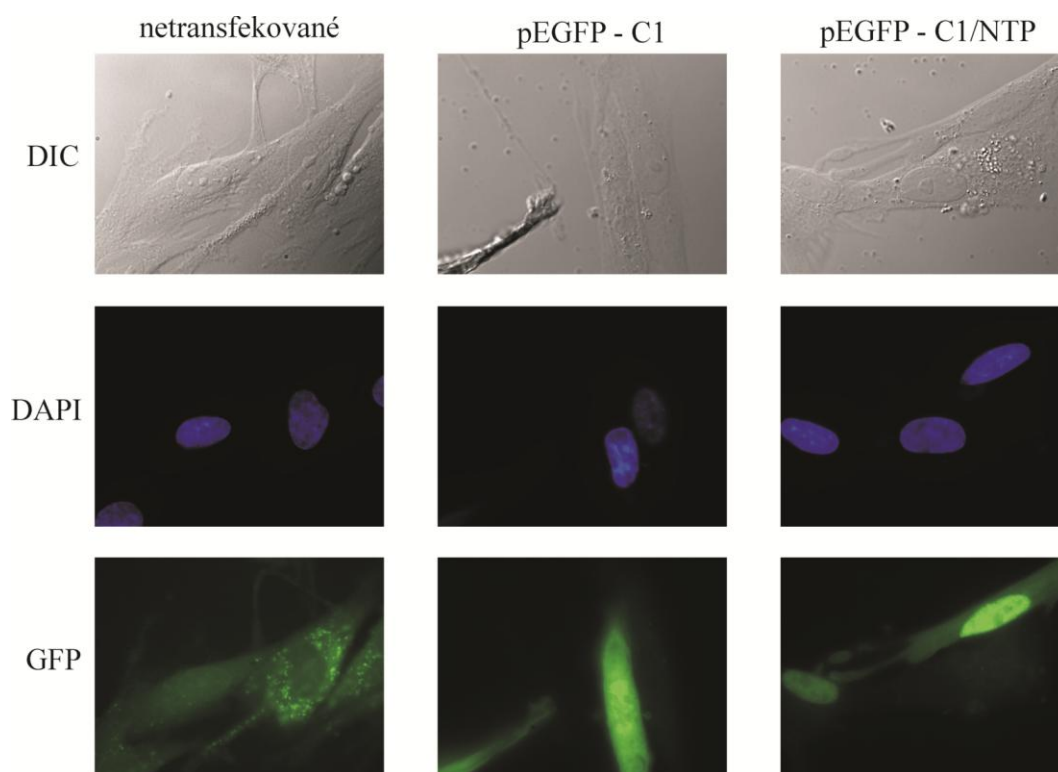
Pomocí elektroporátoru jsem ligační směsí transformovala suspenzi kompetentních bakterií *E. coli* kmene XL-1 Blue. Suspenzi transformovaných bakterií jsem vysela ve třech různých objemech (100, 200, 700 μ l) na Petriho misky s 2 \times TY agarovým médiem s ampicilinem, jako selekčním agens. Na Petriho miskách s výsevem 200 μ l suspenze transformovaných bakterií *E. coli* narostly desítky kolonií. Náhodně vybraných 8 kolonií z každé z těchto misek jsem přečárkovala na čerstvé Petriho misky s 2 \times TY agarovým médiem

s ampicilinem a nechala kultivovat při 37°C do druhého dne. Ze všech narostlých kolonií jsem minipreparací vyizolovala plazmidovou DNA u které jsem pak testovala přítomnost inzertu štěpením restrikčními enzymy. Použila jsem restrikční endonukleázu BclI štěpící rekombinantní vektor MigR1/NTP v oblasti NTP domény IL-1 α . Výsledek jsem odečetla z agaróзовé elektroforézy. Plazmid byl následně osekvenován v oblasti inzertu. Ověřené klony transformovaných bakterií *E. coli* kmene XL-1 Blue nesoucí rekombinantní vektor MigR1/NTP jsem dlouhodobě uchovávala v 25% glycerolu při -70°C.

4.3 Transientní transfekce savčí buněčné linie Mrc-5

Připravený plazmid pEGFP-C1/NTP, vyizolovaný pomocí soupravy XNAPS Plasmid Endofree Flexspin Kit, jsem použila pro transfekci lidské buněčné linie Mrc-5. Jedná se o sekundární, nenádorovou, buněčnou linii odvozenou od lidských fetálních plicních fibroblastů. Tato buněčná linie je adherentní a má omezený počet dělení (42-48), poté buňky dospějí do stádia senescence a umírají. Buněčnou linii Mrc-5 jsem, z pro mne dostupných linií savčích buněk, zvolila jako model zdravé, netransformované buňky. K transientní transfekci buněk linie Mrc-5 jsem použila transfekční reagentii ExGen 500. Postupovala jsem podle návodu výrobce a v prvních pokusech jsem použila jím optimalizované a doporučené množství plazmidové DNA (3 μ g) i transfekční reagentie (9,8 μ l). Buňky jsem den před plánovanou transfekcí pasážovala a počítala pomocí Bürkerovy komůrky. Požadované konfluency 50-70% jsem u buněčné linie Mrc-5 dosahovala nasazením 4.0x10⁵ buněk do jedné jamky šestijamkové kultivační desky („6 well“/Ø jamky 35 mm). Na dno jamky jsem umístila etanolem odmaštěné a v PBS 3krát opláchnuté krycí mikroskopické sklíčko. Po kultivaci 24 hodin v termostatu při 37°C a 5% CO₂ jsem buňky transfekovala dle návodu výrobce připraveným transfekčním roztokem plazmidové DNA a transfekční reagentie ExGen 500. Jako pozitivní kontrolu úspěšnosti transfekce jsem použila buňky Mrc-5 transfekované vektorem pEGFP-C1, tedy výchozím vektorem, který nese gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Jako negativní kontrolu jsem použila netransfekované buňky Mrc-5, které, až na vlastní transientní transfekci, prošly všemi ostatními kroky shodně s buňkami transfekovanými. Po dalších 24

hodinách jsem připravila dočasné preparáty na fluorescenční mikroskopii (obr. 4.3.1). Netransfekované buňky vykazovaly běžnou autofluorescenci odlišitelnou od fluorescence transfekovaných buněk. Přestože se mi na preparátech podařilo najít buňky vhodné pro fluorescenční mikroskopii, s úrovní exprese plazmidu pEGFP-C2/NTP srovnatelnou s úrovní exprese pEGFP-C1 jako pozitivní kontroly, celková transfekční účinnost byla velmi nízká, nepřesahovala jednotky procent. Pro další pokusy jsem transfekční účinnost plazmidem pEGFP-C1/NTP u linie Mrc-5 optimalizovala.



Obr. 4.3.1 Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC) a fluorescenční mikroskopie fixovaných buněk linie Mrc-5 v 1. sloupci netransfekovaných, ve 2. sloupci transfekovaných plazmidem pEGFP-C1 a ve 3. sloupci transfekovaných plazmidem pEGFP-C1/NTP. Jádra buněk jsou značena pomocí DAPI (zvětšeno 600×).

4.3.1 Optimalizace transfekční účinnosti u savčí buněčné linie Mrc-5 pomocí různých transfekčních agens

Před započítáním pokusů směřujících např. k řízenému ovlivnění lokalizace NTP IL-1 α v savčích buňkách linie Mrc-5 jsem potřebovala zvýšit transfekční účinnost. Tu se mi nepodařilo zlepšit zvýšením množství transfekované plazmidové DNA a k významnému zvýšení nevedla ani série transfekcí se zvyšujícím se poměrem ExGen 500/plazmidová DNA, tedy tzv. počtem ekvivalentů, představujících množství transfekční reagentie potřebné k neutralizaci záporných nábojů fosfátových zbytků DNA. Abych ověřila kvalitu připravené plazmidové DNA a vlastnosti transfekčního reagens ExGen 500, provedla jsem řadu kontrolních transfekcí plazmidem pEGFP-C1/NTP do transformované buněčné linie HEK 293. Připravila jsem preparáty s různými poměry ExGen 500/plazmidová DNA. Ve všech těchto experimentech jsem dosáhla transfekční účinnosti vyšší než 50% a potvrdila jsem vysokou kvalitu připravené plazmidové DNA, jakož i použitelnost transfekčního reagens ExGen 500.

4.3.1.1 Růstová křivka savčí buněčné linie Mrc-5

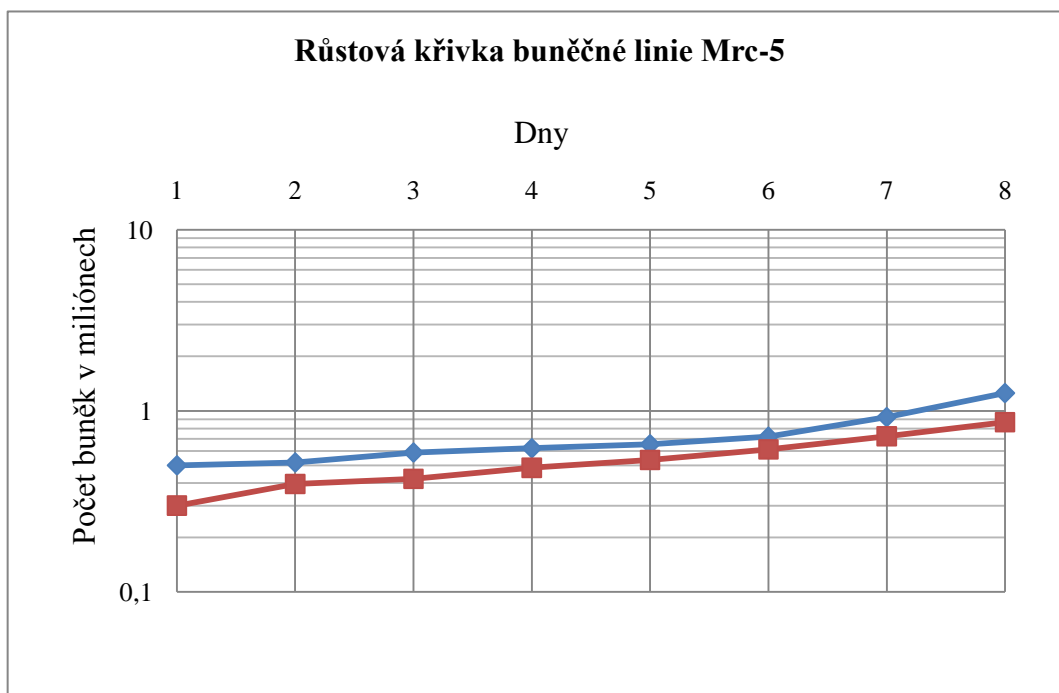
Podle výrobce transfekční reagentie ExGen 500 je schopnost buněk přijímat komplexy ExGen 500/plazmidová DNA nejvyšší v logaritmické fázi růstu buněčné kultury. Obecně by se buňky v kultuře měly množit přibližně exponenciálně (tzv. fáze logaritmického růstu) až do okamžiku, kdy se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (dosažení plató). Abych ověřila, že se kultura ve chvíli transfekce nachází v logaritmické fázi růstu, sestavila jsem růstové křivky buněčné linie Mrc-5 (graf 4.3.1.1.1) s počátečními koncentracemi buněk 0,3 a 0,5 miliónů buněk na jednu kultivační misku Ø 6 cm. Buňky jsem počítala pomocí Bürkerovy komůrky. První den jsem nasadila 0,3 resp. 0,5 miliónů buněk na všechny kultivační misky použité pro počítání buněk v tomto pokusu. Další dny jsem vždy ve stejnou denní dobu počítala buňky narostlé na třech kultivačních miskách z obou počátečních koncentrací. Počty buněk na kultivačních miskách v jednotlivých dnech včetně průměrných hodnot jsou shrnuty v tabulkách 4.3.1.1.1 a 4.3.1.1.2.

Den	Počet buněk v miliónech			Průměr	Směrodatná odchylka
	Miska č. 1	Miska č. 2	Miska č. 3		
1	0,3	0,3	0,3	0,30	0
2	0,393	0,395	0,396	0,395	0,001
3	0,422	0,423	0,419	0,421	0,002
4	0,484	0,483	0,488	0,485	0,002
5	0,537	0,539	0,533	0,536	0,002
6	0,612	0,614	0,611	0,612	0,001
7	0,723	0,721	0,726	0,723	0,002
8	0,868	0,865	0,864	0,866	0,002

Tabulka 4.3.1.1.1 Počty buněk udávané v miliónech na kultivační misce Ø 6 cm. Počáteční koncentrace 0,3 miliónu.

Den	Počet buněk v miliónech			Průměr	Směrodatná odchylka
	Miska č. 1	Miska č. 2	Miska č. 3		
1	0,5	0,5	0,5	0,50	0
2	0,518	0,516	0,522	0,519	0,002
3	0,589	0,586	0,591	0,589	0,002
4	0,621	0,619	0,625	0,622	0,002
5	0,652	0,651	0,658	0,654	0,003
6	0,721	0,716	0,724	0,720	0,003
7	0,924	0,923	0,926	0,924	0,001
8	1,257	1,252	1,259	1,256	0,003

Tabulka 4.3.1.1.2 Počty buněk udávané v miliónech na kultivační misce Ø 6 cm. Počáteční koncentrace 0,5 miliónu.



Graf 4.3.1.1.1 Růstové křivky buněčné linie Mrc-5 s počátečními koncentracemi 0,3 a 0,5 miliónů buněk sestavené z průměrných hodnot uvedených v tabulkách 4.3.1.1.1 a 4.3.1.1.2. Semilogaritmické vynesení.

4.3.1.2 Testování účinnosti různých transfekčních reagensů

Paralelně s přípravou plazmidu MigR1/NTP určeného k enkapsidaci do viru pro virovou transdukcí buněčné linie Mrc-5 jsem testovala různé transfekční reagensie. Kromě původní reagensie ExGen 500 to byly Turbofect, Lipofectamine 2000 a jetPAI. Pomocí transfekčních reagensů jsem buněčnou linii Mrc-5 transfekovala plazmidem pEGFP-C1/NTP. U všech reagensů jsem postupovala podle návodu výrobce. U transfekční reagensie ExGen 500 jsem použila různá množství plazmidové DNA (4, 5 a 6 μg). Transfekční účinnost jsem hodnotila pomocí fluorescenčního mikroskopu. V případě transfekčních reagensů Turbofect, Lipofectamine 2000 a jetPAI jsem buňky počítala v zorném poli přímo na fluorescenčním mikroskopu. U transfekční reagensie ExGen 500 jsem vzhledem k velmi nízké transfekční účinnosti počítala buňky na fotografiích pořízených na fluorescenčním mikroskopu. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 4.3.1.2.1 a 4.3.1.2.2.

Transfekční reagentie	Číslo preparátu	Počet buněk celkem	Počet transfekovaných buněk	Transfekční účinnost
Turbofect	1	81	9	11,11%
	2	103	12	11,65%
	3	97	11	11,34%
	4	83	10	12,05%
Lipofectamine 2000	1	94	3	3,91%
	2	80	3	3,75%
	3	92	5	5,43%
jetPEI	1	89	5	5,62%
	2	78	3	3,85%
ExGen (4μg DNA)	1	5133	8	0,16%
ExGen (5μg DNA)	1	6093	27	0,44%
ExGen (6μg DNA)	1	4840	59	1,22%
	2	4675	77	1,64%

Tabulka 4.3.1.2.1 Srovnání transfekční účinnosti transfekčních reagentů Turbofect, Lipofectamine 2000, jetPAI a ExGen. Pomocí transfekčních reagentů byl do buněk linie Mrc-5 transfekován plazmid pEGFP-C1/NTP.

Transfekční reagentie	Transfekční účinnost
Turbofect	11,54%
Lipofectamine 2000	4,36%
JetPEI	4,73%
ExGen (6μg DNA)	1,43%

Tabulka 4.3.1.2.2 Průměrné hodnoty transfekčních účinností dosažených pomocí transfekčních reagentů Turbofect, Lipofectamine 2000, jetPAI a ExGen.

Dále jsem pracovala pouze s transfekční reagentií Turbofect, při jejímž použití byla transfekční účinnost z použitých reagentů nejvyšší a zvýšením množství použité plazmidové DNA jsem dosáhla transfekční účinnosti cca 18%. Dalšího zvýšení, přes 20%, jsem dosáhla použitím transfekčního média OptiMem při přípravě transfekčního roztoku.

4.3.2 Lokalizace NTP IL-1α u savčí buněčné linie Mrc-5

Od prvních transfekčních pokusů s buněčnou linií Mrc-5 jsem pozorovala jak lokalizaci jadernou, tak lokalizaci difúzní, s fluorescenčním signálem v celé buňce. Zajímavé bylo, že jeden typ lokalizace na konkrétním preparátu často

převládal. Po několikerém pozorování jsem si všimla závislosti převládajícího typu lokalizace na míře konfluenci buněk. Bohužel docházelo k rozdílům ve výsledné konfluenci, i když jsem pokaždé nasazovala stejný počet buněk. Míra konfluenci buněčné kultury nebyla spolehlivým způsobem vedoucím k dalšímu pozorování tohoto fenoménu.

4.3.3 Vliv konfluenci na lokalizaci NTP IL-1 α u savčí buněčné linie Mrc-5

Závislost buněčné lokalizace NTP IL-1 α na dosažené konfluenci buněčné linie Mrc-5 jsem se pokusila potvrdit pokusy, ve kterých jsem cíleně nasazovala buňky tak, aby v době transfekce byly buď téměř konfluentní, nebo jejich konfluenci dosahovala o málo více než 50%. Při konfluenci výrazně nižší než 50% často docházelo k úplnému odumření buněčné kultury a to se neměnilo ani použitím tzv. kondicionovaného média. Kondicionované médium je takové kultivační médium, ve kterém se před použitím nechají po určitou dobu růst vhodné, v mém případě totožné, buňky, které do média produkují vlastní růstové faktory. Konfluenci pod 50% také nedoporučuje výrobce používané transfekční reagentie ExGen 500 a skutečně pokud takto nasazená kultura přežila a transfekovala jsem ji, byla transfekční účinnost odhadem v řádu promile (např. 4 pozitivně transfekované buňky na jednom krycím mikroskopickém sklíčku). Jako negativní kontroly jsem ve všech čtyřech pokusech použila netransfekované buňky, které vykazovaly pouze běžnou autofluorescenci, a jako pozitivní kontroly jsem použila buňky transfekované prázdným výchozím vektorem pEGFP-C1 nesoucím gen pro GFP. Výsledky vlivu konfluenci na lokalizaci NTP IL-1 α jsou shrnuty v tabulce 4.3.3.1. Jedná se o čtyři pokusy prováděné nezávisle na sobě v různých dnech. Pokusy jsem prováděla na buňkách linie Mrc-5, které byly pasážovány přibližně 20-25krát. Buňky jsem počítala v zorném poli fluorescenčního mikroskopu na dočasných imunofluorescenčních preparátech připravených 24 hodin po transienční transfekci. Ve všech čtyřech pokusech převažovala v konfluentních kulturách jaderná lokalizace NTP IL- α , zatímco v kulturách s nízkou konfluencí převládala cytoplazmatická lokalizace NTP IL- α .

Konfluence	Číslo pokusu	1		2		3		4	
	Lokalizace	Počet buněk	%	Počet buněk	%	Počet buněk	%	Počet buněk	%
Konfluentní	Jádro	19	65,52	69	65,71	83	80,58	78	50,65
	Cytoplazma	10	34,48	36	34,29	20	19,42	76	49,35
	Celkem	29		105		103		154	
Konfluence 50%	Jádro	12	34,29	31	36,05	4	6,67	13	19,70
	Cytoplazma	23	65,71	55	63,95	56	93,33	53	80,30
	Celkem	35		86		60		66	

Tabulka 4.3.3.1 Vliv konfluence buněčné kultury linie Mrc-5 na lokalizaci NTP IL-1 α v buňkách. Buňky byly počítány v zorném poli fluorescenčního mikroskopu na dočasných imunofluorescenčních preparátech připravených 24 hodin po transfekci buněk plazmidem pEGFP-C1/NTP. Jako negativní kontroly byly použity netransfekované buňky, jako pozitivní kontroly byly použity buňky transfekované prázdným výchozím vektorem pEGFP-C1 nesoucím gen pro GFP.

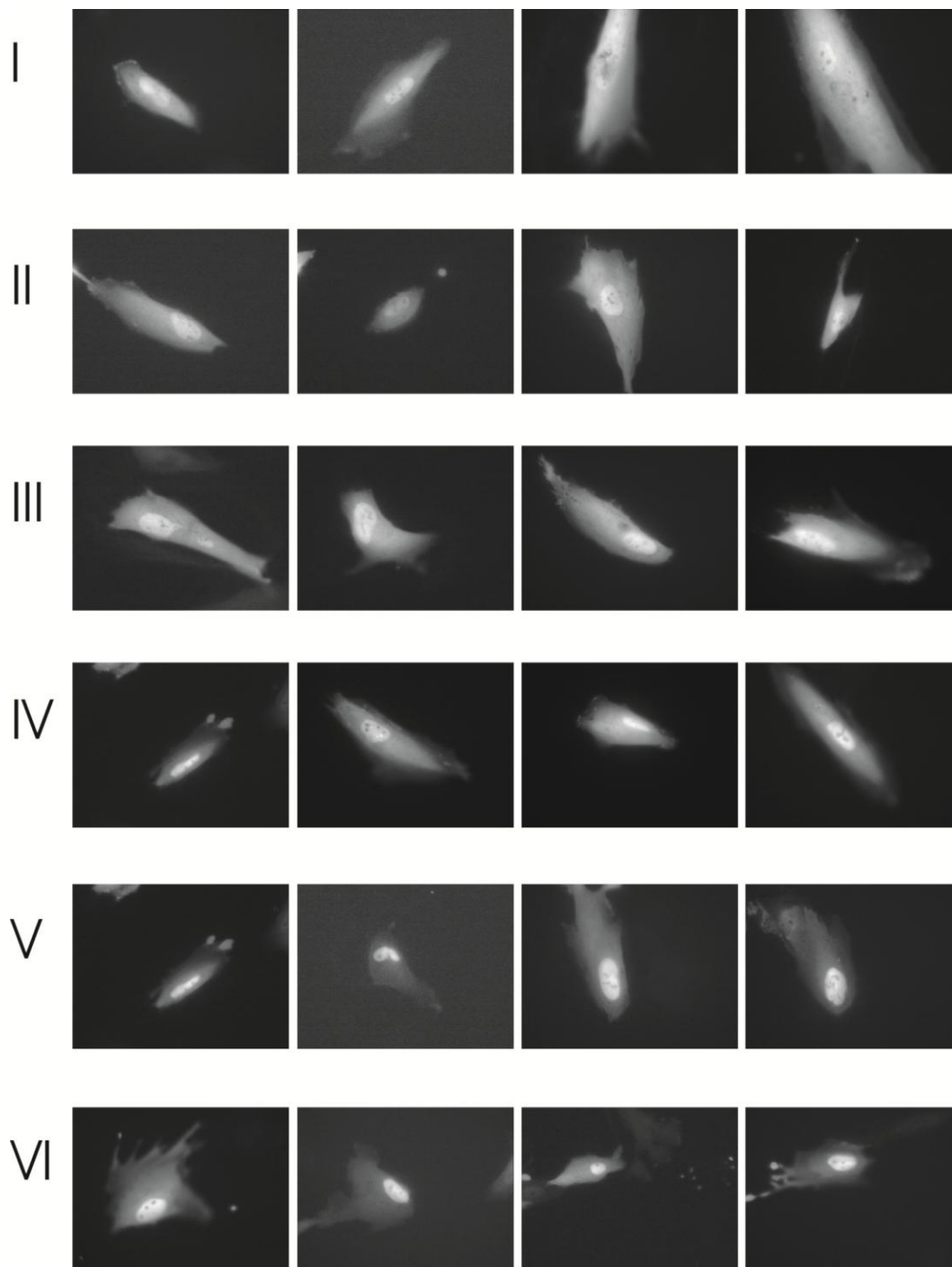
4.4 Ovlivnění buněčné lokalizace NTP IL-1 α u savčí buněčné linie Mrc-5

Po opakovaném pozorování odlišné lokalizace NTP IL-1 α způsobené konfluencí buněčné linie Mrc-5 jsem začala hledat lépe kvantifikovatelný způsob, kterým by bylo možné navodit relokazaci NTP IL-1 α do jádra, jak tomu bylo u buněk v kultuře s vyšší konfluencí.

4.4.1 Ovlivnění lokalizace působky v médiu

Vzhledem k výsledkům pokusů s mírou konfluence se nabízela myšlenka, že by za jadernou relokazací NTP IL-1 α mohl stát nějaký působek v médiu. Takového působku by v médiu buněk s plnou konfluencí bylo přirozeně více. Připravila jsem dva typy pokusů. V prvním případě jsem buňkám linie Mrc-5 s konfluencí 60-70% 24 hodin po transienční transfekci plazmidem pEGFP-C1/NTP odstranila veškeré médium a buňky jsem dvakrát opláchla čerstvým médiem. Takto ošetřené transfekované buňky jsem zalila čerstvým médiem s různou koncentrací kondicionovaného média. Termín kondicionované médium v tomto i v druhém pokusu označuje médium, ve kterém byly kultivovány buňky linie Mrc-5 jeden týden, kdy dosáhly plné konfluence. Namíchala jsem média I-VI: I-2 ml čerstvého

média; II-2 ml čerstvého média+1 μ l kondicionovaného média; III-2 ml čerstvého média+4 μ l kondicionovaného média; IV-2 ml čerstvého média+40 μ l kondicionovaného média; V-1ml čerstvého média+1ml kondicionovaného média; VI-2 ml kondicionovaného média. Po dvou hodinách od výměny média jsem analyzovala buněčnou lokalizaci NTP IL-1 α pomocí fluorescenčního mikroskopu. Mikroskopovány byly živé buňky, kultivované na miskách určených pro mikroskopii živých buněk s integrovaným sklíčkem (In Vitro Scientific). Snímky na obrázku 4.4.1.1 zachycují vždy čtveřice buněk majoritně zastoupené mezi buňkami kultivovanými v médiu s danou koncentrací kondicionovaného média. V tabulce 4.4.1.1 jsou uvedeny počty buněk s jadernou či cytoplazmatickou lokalizací a také jejich procentuální zastoupení v jednotlivých médiích.



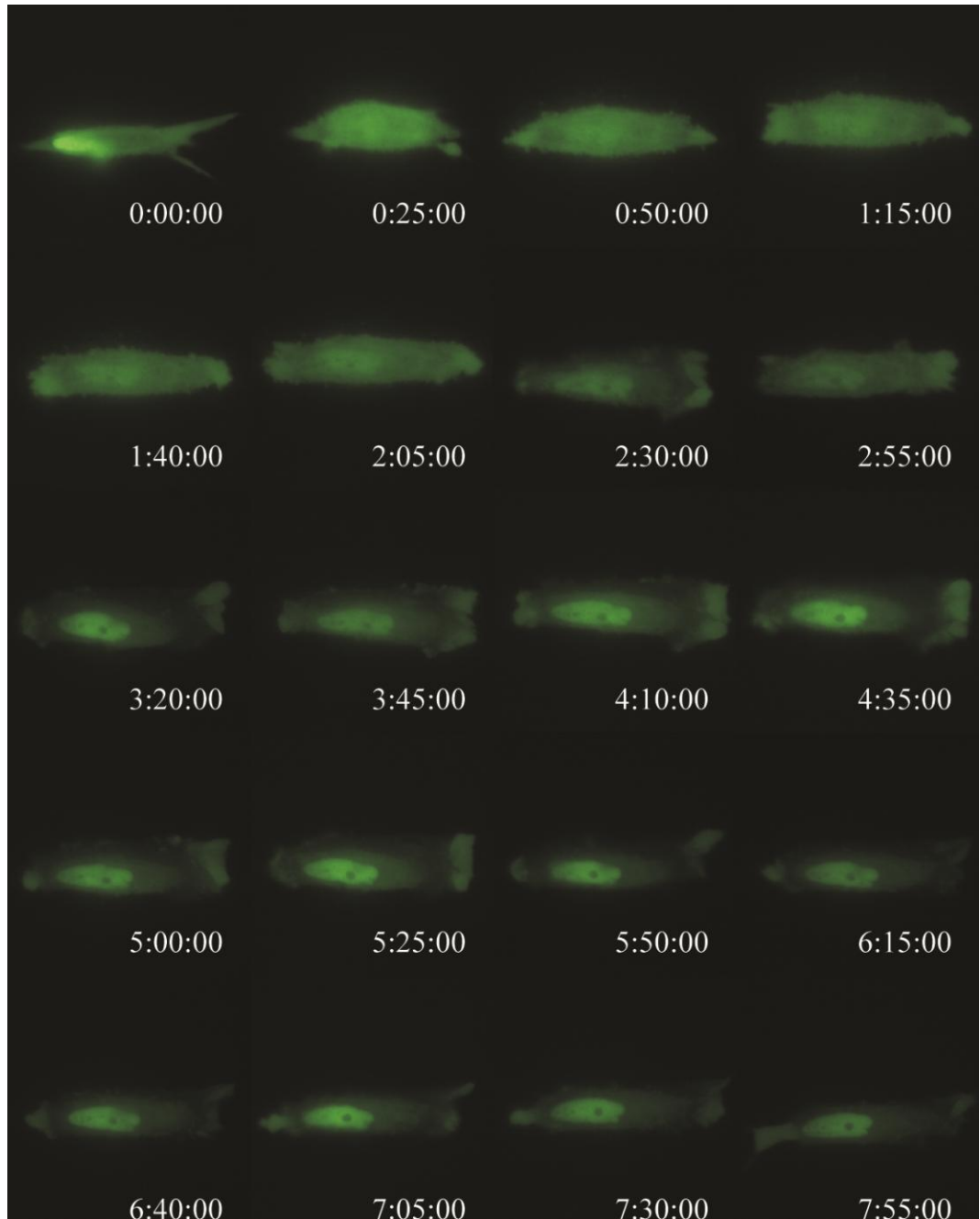
Obr. 4.4.1.1 Fluorescenční mikroskopie živých buněk linie Mrc-5 transientně transfekovaných plazmidem pEGFP-C1/NTP. Buňkám bylo 24 hodin po transfekci vyměněno médium a před pořízením snímků byly 2 hodiny kultivovány v médiích o různé koncentraci kondicionovaného média: I-2 ml čerstvého média; II-2 ml čerstvého média+1 μ l kondicionovaného média; III-2 ml čerstvého média+4 μ l kondicionovaného média; IV-2 ml čerstvého média+40 μ l kondicionovaného média; V-1ml čerstvého média+1ml kondicionovaného média; VI-2 ml kondicionovaného média (zvětšeno 600 \times).

Médium	Lokalizace		Počet buněk	%
I	jádro		8	9,76
	cytoplazma		74	90,24
		celkem	82	
II	jádro		11	11,58
	cytoplazma		84	88,42
		celkem	95	
III	jádro		25	26,04
	cytoplazma		71	73,96
		celkem	96	
IV	jádro		39	58,15
	cytoplazma		45	41,85
		celkem	93	
V	jádro		65	73,03
	cytoplazma		24	26,97
		celkem	89	
VI	jádro		71	83,53
	cytoplazma		14	16,47
		celkem	85	

Tabulka 4.4.1.1 Vliv množství kondicionovaného média v celkovém objemu kultivačního média na buněčnou lokalizaci NTP IL-1 α v živých buňkách linie Mrc-5 transientně transfekovaných plazmidem pEGFP-C1/NTP. Buňkám bylo 24 hodin po transfekci vyměněno médium a před počítáním byly 2 hodiny kultivovány v médiích o různé koncentraci kondicionovaného média: I-2 ml čerstvého média; II-2 ml čerstvého média+1 μ l kondicionovaného média; III-2 ml čerstvého média+4 μ l kondicionovaného média; IV-2 ml čerstvého média+40 μ l kondicionovaného média; V-1ml čerstvého média+1ml kondicionovaného média; VI-2 ml kondicionovaného média. Buňky byly počítány v zorném poli fluorescenčního mikroskopu.

V druhém pokusu jsem buňkám buněčné linie Mrc-5 s konfluencí 60-70% 24 hodin po transientní transfekci plazmidem pEGFP-C1/NTP odstranila staré médium a po dvojitém opláchnutí jsem staré médium nahradila čerstvým. Obrázek 4.4.1.2 zachycuje snímky jedné buňky pořízené na fluorescenčním mikroskopu v časovém intervalu 25 minut po dobu osmi hodin. Předpokládala jsem, že pokud buněčnou relokizaci NTP IL-1 α způsobuje působek produkovaný samotnými buňkami, dojde během osmi hodin postupně ke zvýšení jeho koncentrace a projeví se jeho vliv na buněčnou relokizaci NTP IL-1 α . Také v tomto pokusu byly mikroskopovány živé buňky, kultivované na miskách určených pro mikroskopii živých buněk s integrovaným sklíčkem (In Vitro

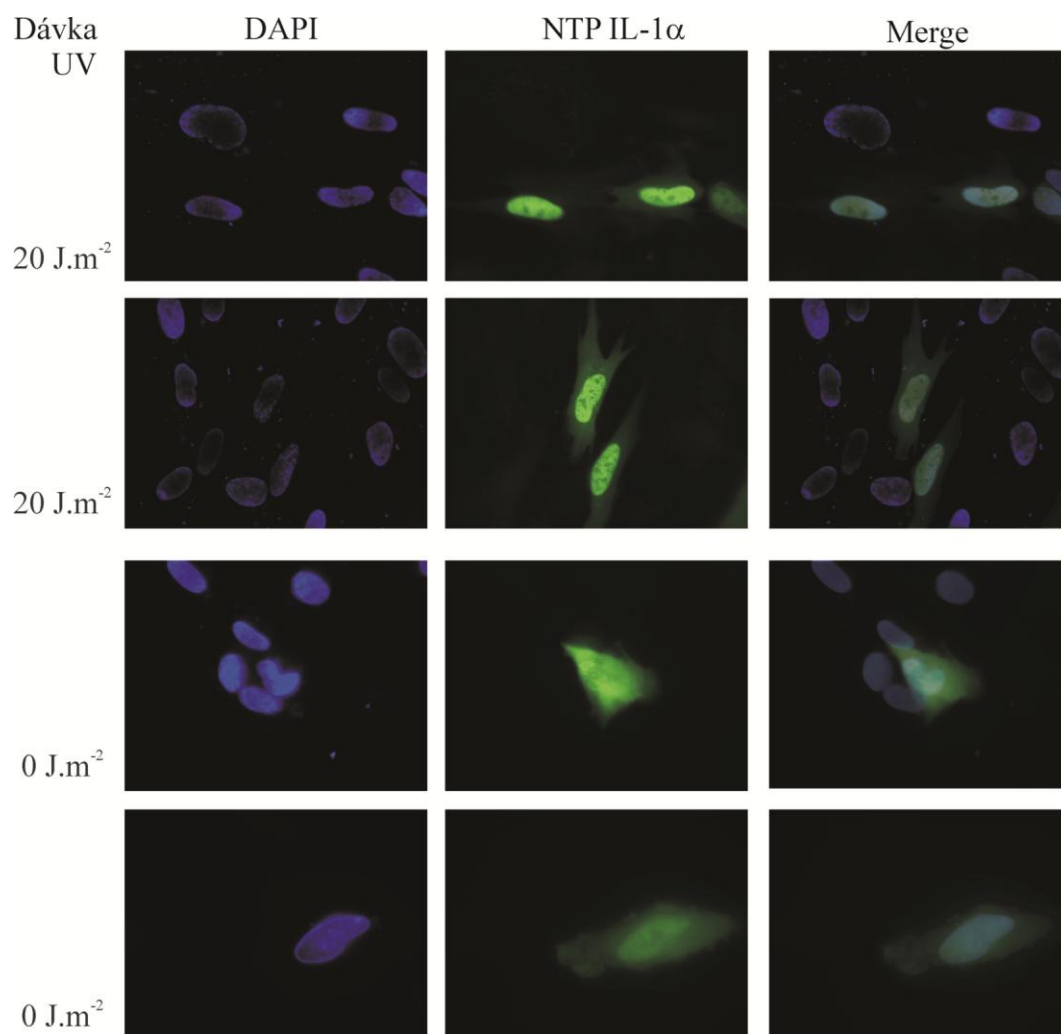
Scientific). Ze snímků je patrné, že původní jaderná lokalizace NTP IL-1 α v čase 0:00:00, tedy v buňkách ovlivněných starým médiem s vyšší koncentrací možných působků, se do půl hodiny od výměny starého média za čerstvé kompletní médium mění v lokalizaci cytoplazmatickou. Ke změně lokalizace NTP IL-1 α zpět na jadernou dochází v čase 2:30:00 a až do konce pokusu se nemění.



Obr. 4.4.1.2 Fluorescenční mikroskopie živých buněk linie Mrc-5 transientně transfekovaných plazmidem pEGFP-C1/NTP. Buňkám bylo 24 hodin po transfekci vyměněno médium za čerstvé kompletní médium a po dobu 8 hodin byla snímána jedna buňka v časových intervalech 25 minut (zvětšeno 600 \times).

4.4.2 Ovlivnění buněčné lokalizace NTP-IL-1 α prostřednictvím UV

Po ozáření buněk, případně po jejich ošetření médiem z buněk vystavených radiačnímu záření, dochází ke zvyšování intracelulárních hladin interleukinu-1 α a tumor supresorového proteinu p53 (ÖSTERREICHER et al., 2003). Vzhledem k tomu, že podle našich předběžných experimentů interaguje IL-1 α s proteinem p53 (POSPÍŠEK, osobní sdělení), otestovala jsem možnost vyvolání jaderné lokalizace IL-1 NTP pomocí UV záření. Nejprve jsem optimalizovala dávku UV záření tak, aby 24 hodin po ozáření buněk o konfluenci 70% byla konfluence 40-50%. Použila jsem tyto dávky UV záření: 2 J.m⁻², 10 J.m⁻², 20 J.m⁻², 40 J.m⁻² a 60 J.m⁻². Buňky buněčné linie Mrc-5 transientně transfekované plazmidem pEGFP-C1/NTP jsem 24 hodin po transientní transfekci při konfluenci 70 % po odsátí média ozářila UV zářením o dané dávce v přístroji Stratagene UV crosslinker a zalila jsem je čerstvým kompletním médiem. Po dvaceti hodinách jsem připravila imunofluorescenční preparáty s fixovanými buňkami, které jsem hodnotila pomocí fluorescenčního mikroskopu (obr. 4.4.2.1). Zjištěná optimální dávka UV záření splňující výše uvedené požadavky je 20 J.m⁻². Na preparátech ošetřených UV zářením převládala jaderná lokalizace NTP IL-1 α .

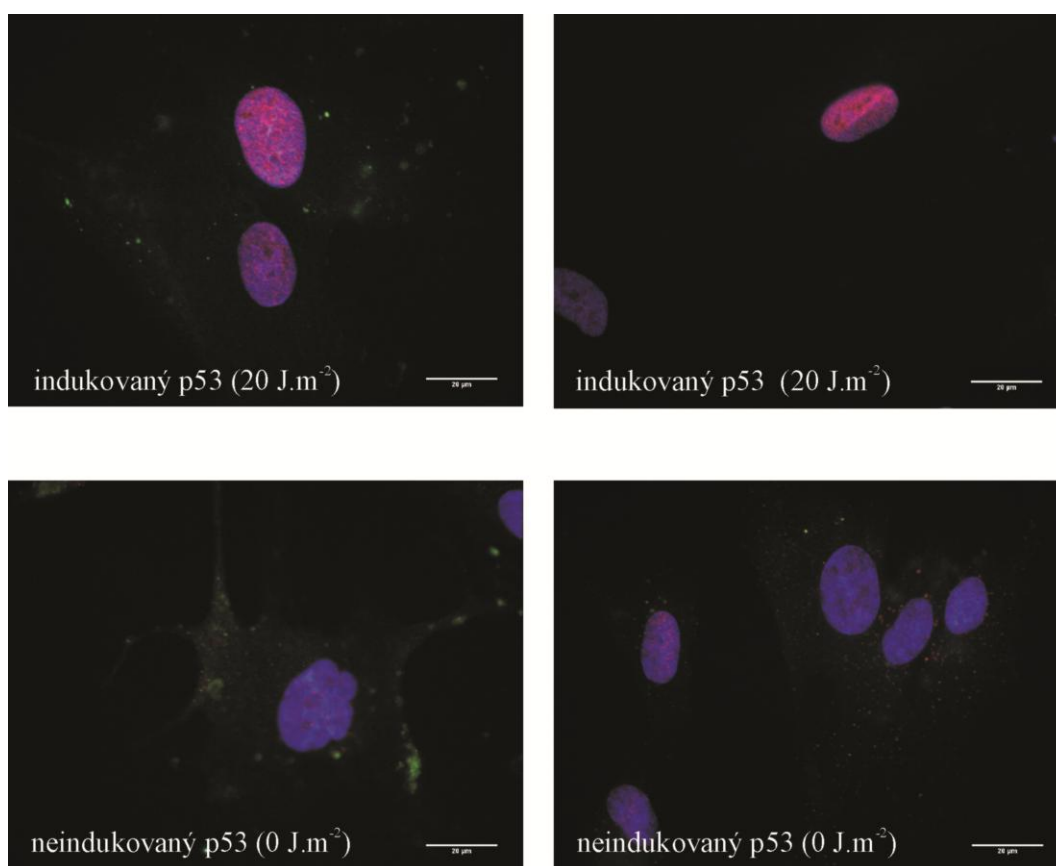


Obr. 4.4.2.1 Fluorescenční mikroskopie buněk linie Mrc-5 24 hodin po transienční transfekci plazmidem pEGFP-C1/NTP ošetřených v 1. a 2. řádku UV zářením o dávce 20 J.m⁻². Ve 3. a 4. řádku jsou buňky stejné linie neozářené UV světlem. Dvacet hodin po ozáření byly připraveny imunofluorescenční preparáty včetně značení jader pomocí DAPI (zvětšeno 600 \times).

4.5 Indukce p53

Tumor supresorový protein p53 se za normálních okolností vyskytuje v buňce v latentní formě s nízkou DNA vazebnou aktivitou a ve velmi nízké koncentraci. K aktivaci proteinu p53 dojde po vystavení buňky různým druhům stresů vedoucím k poškození DNA. Zpětnou vazbou dochází k p53-dependentní transkripci genu pro protein MDM2, který zprostředkovává degradaci tumor supresorového proteinu p53. Ke stabilizaci proteinu p53 lze použít sloučeninu roscovitin inhibující expresi MDM2.

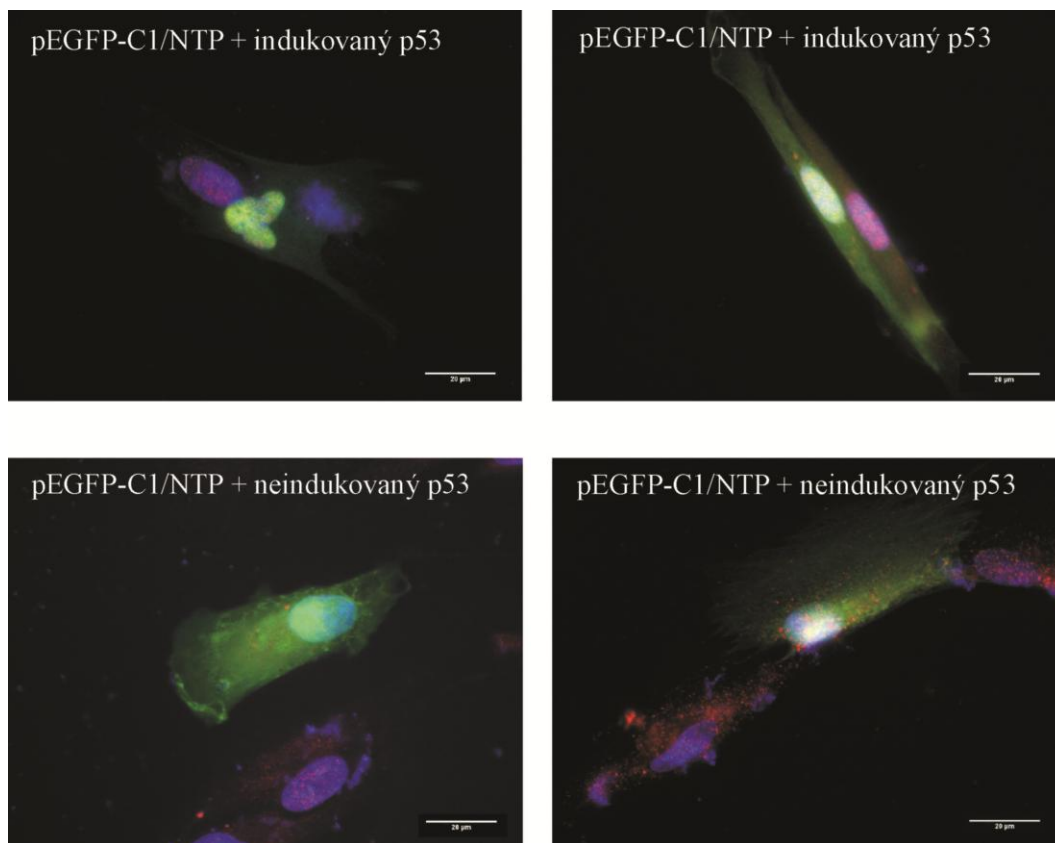
Tumor supresorový protein p53 jsem v buňkách linie Mrc-5 aktivovala prostřednictvím UV záření. Při konfluenci 70 % jsem buňky po odsátí média ozářila UV zářením o dávce 20 J.m^{-2} v přístroji Stratagene UV crosslinker a do čerstvého média jsem přidala roscovitin ve výsledné koncentraci $20 \mu\text{M}$. Po dvaceti hodinách jsem připravila imunofluorescenční preparáty s fixovanými buňkami. Použila jsem primární monoklonální myší protilátku specifickou pro p53 a sekundární protilátku anti-mouse konjugovanou s fluorochromem Alexa Red 594. Úspěšnost indukce proteinu p53 jsem hodnotila na fluorescenčním mikroskopu. Na obrázku 4.5.1 jsou v první řádce dva snímky buněk s indukovaným proteinem p53 a v druhé řádce dva snímky s neindukovaným proteinem p53. V buňkách s indukovaným proteinem p53 je protein p53 lokalizovaný v buněčném jádře a pozorujeme silný fluorescenční signál. V buňkách s neindukovaným proteinem p53 se nachází malé množství tohoto proteinu v celé buňce.



Obr. 4.5.1 Fluorescenční mikroskopie buněk linie Mrc-5 s proteinem p53 značeným monoklonální myší protilátkou specifickou pro p53 a sekundární protilátkou anti-mouse konjugovanou s fluorochromem Alexa Red 594. V 1. řádce jsou dva snímky s indukovaným proteinem p53. Protein p53 byl aktivován UV zářením o dávce 20 J.m^{-2} a stabilizován $20 \mu\text{M}$ roztokem roscovitinu. V 2. řádce jsou dva snímky s neindukovaným proteinem p53. Imunofluorescenční preparáty včetně značení jader pomocí DAPI byly připraveny 20 hodin po ozáření (zvětšeno $600\times$).

Analogický pokus s indukovaným proteinem p53 jsem připravila také s buňkami linie Mrc-5 transientně transfekovanými plazmidem pEGFP-C1/NTP. Buňky byly ozářeny 12 hodin po transientní transfekci. Ostatní kroky byly stejné jako v předchozím pokusu. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda je lokalizace NTP IL-1 α a indukovaného tumor supresorového proteinu p53 po ozáření UV světlem v určitém čase stejná a jestli by tedy bylo efektivní přistoupit v další fázi pokusů k prokázání či vyvrácení kolokalizace těchto dvou proteinů odpovídajícími metodami např. pomocí metody FRET. Na snímcích obr. 4.5.2 v první řádce je v buňkách transientně transfekovaných plazmidem pEGFP-C1/NTP po ozáření

UV světlem o dávce 20 J.m^{-2} a stabilizaci roztokem roscovitinu indukovaný protein p53 lokalizovaný v jádře stejně tak jako NTP IL-1 α . V buňkách neošetřených UV zářením jsou fluorescenční signály proteinu p53 značeného protilátkami i NTP IL-1 α difúzní.



Obr. 4.5.2 Fluorescenční mikroskopie buněk linie Mrc-5 12 hodin po transienční transfekci plazmidem pEGFP-C1/NTP ošetřených na snímcích v 1. řádku dávkou 20 J.m^{-2} UV záření (s indukovaným proteinem p53), v 2. řádku neozářené UV světlem (s neindukovaným proteinem p53). Dvacet hodin po ozáření byly připraveny imunofluorescenční preparáty včetně značení jader pomocí DAPI. Protein p53 je značen primární monoklonální myší protilátkou specifickou pro p53 a sekundární protilátkou anti-mouse konjugovanou s fluorochromem Alexa Red 594 (zvětšeno $600\times$).

5 Diskuze

Interleukin-1 α se *in vivo* extracelulárně v tělních tekutinách organismu vyskytuje jen vzácně a když, tak v průběhu závažných patologických stavů (DINARELLO, 1996), případně po nekrotickém způsobu smrti buněk (CHEN et al., 2007; EIGENBROD et al., 2008). Ačkoliv je syntetizován monocyty a aktivovanými makrofágy a může být z aktivovaných makrofágů uvolněn a prostřednictvím vazby na odpovídající membránové receptory spustit dráhu signální transdukce (MAWATARI et al., 1989; GAO et al., 1995), zároveň se vyskytuje konstitutivně v buňkách mezenchymálního původu např. v keratinocytech, v buňkách endotelu, v epitelálních buňkách ledvin, plic a gastrointestinálního traktu (DINARELLO, 2011) a v současné době převládá názor, že interleukin-1 α je forma interleukinu-1, která zůstává uvnitř buněk a působí jako intrakrinní faktor.

Prekurzor interleukinu-1 α postrádá klasickou sekretorickou sekvenci a obsahuje ve své vysoce konzervované N-terminální doméně jaderný lokalizační signál (WESSENDORF et al., 1993). N-terminální doména může být enzymaticky odštěpena Ca²⁺ aktivovanou proteázou calpainem (KOBAYASHI et al., 1990). Jak prekurzorová forma, tak i odštěpená N-terminální doména IL-1 α obsahují jadernou lokalizační sekvenci, ale údaje o jejich vnitrobuněčné lokalizaci se rozcházejí. Je pravděpodobné, že klidová lokalizace je tkáňově specifická (HU et al., 2003) a závisí na aktuálním stavu buňky a okolní tkáni (WERMAN et al., 2004; LUHESHI et al., 2009 a). Řada autorů předpokládá, že N-terminální doména není vzhledem ke schopnosti jaderné translokace a vysoké míře konzervovanosti (YIN et al., 2001) jen vedlejší produkt proteolytického štěpení prekurzoru interleukinu-1 α na maturovaný interleukin-1 α (BURYSKOVA et al., 2004) a snaží se nalézt její intracelulární, případně jadernou funkci.

Jedním z cílů této práce, v rámci širšího výzkumu zaměřeného na studium jaderné funkce interleukinu-1 α , bylo zkonstruovat rekombinantní vektor nesoucí gen pro N-terminální doménu interleukinu-1 a prostřednictvím transienční transfekce do lidské buněčné linie studovat subcelulární lokalizaci N-terminální domény

interleukinu-1 α pomocí fluorescenční mikroskopie. Jako výchozí vektor jsem zvolila pEGFP-C1 nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein GFP a pro expresi NTP domény IL-1 α v lidské buněčné linii jsem zkonstruovala rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP.

Z pro mne dostupných buněčných linií jsem zvolila lidskou buněčnou linii Mrc-5. Jedná se o adherentní sekundární nenádorovou buněčnou linii zdravých diploidních lidských fetálních plicních fibroblastů s omezeným počtem dělení. S ohledem na další cíl mé diplomové práce, kterým bylo s pomocí fluorescenční mikroskopie studovat proteiny potenciálně interagující s N-terminální doménou IL-1 α , a vzhledem k tomu, že podle našich předběžných experimentů interaguje IL-1 α s tumor supresorovým proteinem p53 (POSPÍŠEK, osobní sdělení), na který jsem se proto soustředila, jsem tuto buněčnou linii zvolila jako model zdravé, netransformované buňky.

Při transienčních transfekcích rekombinantního vektoru pEGFP-C1/NTP do buněk linie Mrc-5 jsem zpočátku narazila na technické potíže, které se postupně podařilo alespoň částečně vyřešit. Prvním problémem byla nízká transfekční účinnost vybraného média, kterou bylo třeba optimalizovat. Dále buněčná linie Mrc-5 citlivě reagovala na různé mechanické podněty, jako byla rozdílná intenzita resuspendace buněčné kultury nebo odlišný povrch, na který měly buňky adherovat. Nicméně prostřednictvím těchto počátečních dílčích neúspěchů jsem si, díky vysokému počtu provedených transfekčních pokusů, měla možnost všimnout rozdílné lokalizace N-terminální domény na preparátech s různou konfluencí. V konfluentních kulturách transienčně transfekovaných rekombinantním vektorem pEGFP-C1/NTP převažovala jaderná lokalizace N-terminální domény IL- α , zatímco v kulturách s nízkou konfluencí převládala cytoplazmatická lokalizace N-terminální domény IL- α . Podobný pokus provedla Luheshi a kol. s prekurzorem interleukinu-1 α a výsledek jejich pozorování byl opačný. U vysoce konfluentní kultury buněk mikroglií pozorovala vyšší zastoupení buněk s cytosolickou lokalizací prekurzoru interleukinu-1. Za příčinu tohoto fenoménu označila, po vyloučení ovlivnění relokalizace prekurzoru

interleukinu-1 působky kondicionovaného média, mezibuněčné kontakty. Důvodem jaderné relokalizace je podle Luheshi a kol. retence prekursoru interleukinu-1 α v jádře jako prevence jeho uvolnění a působení jako DAMP („damage-associated molecular patterns“) ve vztahu k rozvoji sterilního zánětu (LUHESHI et al., 2009 a). U N-terminální domény interleukinu-1 α jsem naopak pozorovala ovlivnění relokalizace prostřednictvím působků v médiu, ať již v pokusech se zvyšujícími se koncentracemi kondicionovaného média, nebo v pokusech zachycujících jednu buňku po dobu osmi hodin od výměny starého média za nové kompletní médium v časových intervalech 25 minut. U tohoto pokusu jsem předpokládala, že v průběhu pokusu trvajících osm hodin buňky samy vytvoří působky schopné relokalizaci N-terminální domény ovlivnit. Ve všech těchto případech vyšší koncentrace působku způsobila jadernou relokalizaci N-terminální domény interleukinu-1 α ve většině pozorovaných buněk. Je pravděpodobné, že i když, stejně jako u prekursoru interleukinu-1 α , po spuštění apoptózy dochází ke snížení pohyblivosti N-terminální domény interleukinu-1 α v rámci nukleoplazmy (COHEN et al., 2010), má její jaderná relokalizace jinou funkci, než její retenci ve smyslu zábrany jejího uvolnění do extracelulárního prostoru v případě nekrotického způsobu smrti buněk z důvodu prevence rozvoje sterilního zánětu, jako je tomu u prekursoru interleukinu-1 (CHEN et al., 2007).

Po ozáření buněk, ale i po jejich ošetření médiem z buněk vystavených radiačnímu záření, dochází ke zvyšování intracelulárních hladin interleukinu-1 α a tumor supresorového proteinu p53 (ÖSTERREICHER et al., 2003). V důsledku působení UV světla nebo ionizujícího záření dochází pomocí transkripčního koaktivátoru p300 a histonacetyltransferázového komplexu PCAF k acetylaci p53, čímž dojde ke zvýšení jeho DNA vazebné schopnosti (LIU et al., 1999). Se stejnými histonacetyltransferázami interaguje také N-terminální doména interleukinu-1 α (BURYSKOVA et al., 2004) s dosud ne zcela prokázanými důsledky.

Vzhledem k tomu, že podle našich předběžných experimentů interaguje IL-1 α s tumor supresorovým proteinem p53 (POSPÍŠEK, osobní sdělení), otestovala

jsem možnost vyvolání jaderné lokalizace IL-1 NTP pomocí UV záření. Buňky linie Mrc-5 jsem po transientní transfekci rekombinantním vektorem pEGFP-C1/NTP ozářila optimální dávkou UV záření, která byla u buněk této linie 20 J.m^{-2} . Subcelulární lokalizaci N-terminální domény IL-1 α jsme hodnotila pomocí fluorescenčního mikroskopu a dvacet hodin po ozáření na preparátech ošetřených UV zářením převládala jaderná lokalizace NTP IL-1 α . Stejně tak indukovaný a roztokem roscovitinu stabilizovaný tumor supresorový protein p53 je dvacet hodin po ozáření na preparátech ošetřených dávkou 20 J.m^{-2} UV zářením lokalizován v jádře. Protože by se vzhledem k prokázanému radioprotektivnímu účinku interleukinu-1 α (PERLSTEIN et al., 1995) dalo v případě prokázání kolokalizace N-terminální domény s tumor supresorovým proteinem p53 hypoteticky uvažovat o její schopnosti ovlivňovat aktivitu proteinu p53, připravila jsem pokus zaměřený na zjištění lokalizace obou těchto proteinů v konkrétních buňkách linie Mrc-5 po ozáření UV světlem ve stejném čase. Výsledek pokusu hodnocený pomocí fluorescenční mikroskopie ukazuje, že po ozáření UV světlem jak N-terminální doména interleukinu-1 α , tak i tumor supresorový protein p53 relokalizují do jádra buněk linie Mrc-5 a lze se domnívat, že má smysl přistoupit k pokročilejším technikám schopným potvrdit či vyvrátit kolokalizaci těchto dvou proteinů např. metodou FRET a následně ke studiu mechanismů, jakými se mohou vzájemně ovlivňovat. V úvahu přichází např. možnost, že by interakce N-terminální domény interleukinu-1 α s histonacetyltransferázami mohla ovlivňovat jejich schopnost modulace aktivity tumor supresorového proteinu p53 (VICENOVA, 2005). V případě prokázání přímé kolokalizace by se dalo uvažovat o schopnosti N-terminální domény interleukinu-1 α reaktivovat nefunkční tumorsupresorový protein p53 např. modifikací vedoucí ke zvýšení rezistence proteinu p53 vůči proteolytické degradaci nebo o schopnosti N-terminální domény interleukinu-1 α inhibovat nukleární export proteinu p53 (LANE et al., 2010).

6 Souhrn

- Zkonstruovala jsem rekombinantní vektor pEGFP-C1/NTP pro expresi N-terminální domény IL-1 α v lidské buněčné linii Mrc-5.
- Provedla jsem optimalizaci transfekční účinnosti pro transientní transfekci buněčné linie Mrc-5.
- Expresi N-terminální domény IL-1 α v buňkách linie Mrc-5 a její lokalizaci jsem sledovala po transientní transfekci rekombinantním vektorem pEGFP-C1/NTP pomocí fluorescenční mikroskopie.
- Definovala jsem některé podmínky subcelulární lokalizace N-terminální domény IL-1 α v závislosti na kultivačních podmínkách.
- Navodila jsem jadernou translokaci N-terminální domény IL-1 α pomocí biologických a fyzikálních faktorů.
- Pomocí imunofluorescenčních metod jsem zjistila, že N-terminální doména IL-1 α a tumor supresorový protein p53 jsou po ozáření buněčné linie Mrc-5 ve stejném čase lokalizovány v jádrech buněk.
- Zkonstruovala jsem rekombinantní vektor MigR1/NTP určený k enkapsidaci do viru pro virovou transdukcí buněk. V průběhu této diplomové práce k transdukcí buněk linie Mrc-5 nedošlo, vektor je připraven k dalšímu použití.

7 Seznam citované literatury

Ahmed CM, Burkhart MA, Mujtaba MG, Subramaniam PS, Johnson HM. (2003) The role of IFN γ nuclear localization sequence in intracellular function. *J Cell Sci.* 116(Pt 15):3089-98.

Alberti L, Thomachot MC, Bachelot T, Menetrier-Caux C, Puisieux I, Blay JY. (2004) IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 111(5):653-61.

Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. (2003) Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 163(1):69-79.

Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. (2009) Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 17(2):152-60.

Beuscher HU, Nickells MW, Colten HR. (1988) The precursor of interleukin-1 alpha is phosphorylated at residue serine 90. *J Biol Chem.* 263(8):4023-8.

Bianchi ME. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 81(1):1-5.

Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. (2002) A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13723-8.

Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, Kim SH, Dinarello CA. (2004) Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J.* 381(Pt 2):503-10.

- Buryskova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T, Burysek L. (2004) Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem.* 279(6):4017-26.
- Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. (2007) IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(1):282-7.
- Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB. (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *J Biol Chem.* 266(19):12162-7.
- Cayrol C, Girard JP. (2009) The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(22):9021-6.
- Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, Voronov E, Martin MU, Dinarello CA, Apte RN. (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(6):2574-9.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. (2005) Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation.* 111(11):1448-54.
- Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, Murali-Krishna K, Aderem A, Flavell RA, Papayannopoulou T, Shayakhmetov DM. (2009) Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity.* 31(1):110-21.
- Dinarello CA. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87(6):2095-147.
- Dinarello CA. (2010) IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 40(3):599-606.
- Dinarello CA. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 117(14):3720-32.

- Dunbar CE, Browder TM, Abrams JS, Nienhuis AW. (1989) COOH-terminal-modified interleukin-3 is retained intracellularly and stimulates autocrine growth. *Science*. 245(4925):1493-6.
- Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Núñez G. (2008) Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol*. 181(12):8194-8.
- Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC. (1991) Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(12):5232-6.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. (2009) The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 10(3):241-7.
- Gao JX, Wilkins J, Issekutz AC. (1995) Migration of human polymorphonuclear leukocytes through a synovial fibroblast barrier is mediated by both beta 2 (CD11/CD18) integrins and the beta 1 (CD29) integrins VLA-5 and VLA-6. *Cell Immunol*. 163(2):178-86.
- Grenfell S, Smithers N, Miller K, Solari R. (1989) Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. *Biochem J*. 264(3):813-22.
- Gu W, Roeder RG. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 90(4):595-606.
- Harris SL, Levine AJ. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24(17):2899-908.
- Haskill S, Martin G, Van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, et al. (1991) cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(9):3681-5.
- Hauser C, Saurat JH, Schmitt A, Jaunin F, Dayer JM. (1986) Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol*. 136(9):3317-23.

- Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM. (2003) A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor p53 modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(17):10008-13.
- Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. (2007) Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 13(7):851-6.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J*. 20(6):1331-40.
- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. (1994) Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 84(12):4242-8.
- Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Böttiger C, Duff GW, Schömig A. (2000) Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 36(7):2168-73.
- Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, Kanno T, Kamatani N, Hara M. (2006) Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(39):14501-6.
- Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. (2000) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*. 408(6809):211-6.
- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(14):5548-52.
- Küchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L, Sorensen DR, De Angelis PM, Scott H, Haraldsen G. (2008) Nuclear interleukin-33 is generally

expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol.* 173(4):1229-42.

Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, Capper EA, Tal-Singer R, Wells GI, Doyle ML, Young PR. (2000) Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem.* 275(14):10308-14.

Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. (1985) Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(4):1204-8.

Lane DP, Cheok CF, Lain S. (2010) p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(9):a001222.

Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 19(2):1202-9.

Lotze MT, Tracey KJ. (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 5(4):331-42.

Luheshi NM, McColl BW, Brough D. (2009) Nuclear retention of IL-1 alpha by necrotic cells: a mechanism to dampen sterile inflammation. *Eur J Immunol.* 39(11):2973-80.

Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D. (2009) Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. *Br J Pharmacol.* 157(8):1318-29.

Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D. (2009) The dynamics and mechanisms of interleukin-1alpha and beta nuclear import. *Traffic.* 10(1):16-25.

Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 408(6810):377-81.

Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. (1994) Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 14(3):1845-51.

- Mandinova A, Soldi R, Graziani I, Bagala C, Bellum S, Landriscina M, Tarantini F, Prudovsky I, Maciag T. (2003) S100A13 mediates the copper-dependent stress induced release of IL-1alpha from both human U937 and murine NIH 3T3 cells. *J Cell Sci.* 116(Pt 13):2687-96.
- Mariotti M, Castiglioni S, Bernardini D, Maier JA. (2006) Interleukin 1 alpha is a marker of endothelial cellular senescent. *Immun Ageing.* 3:4.
- Mawatari M, Kohno K, Mizoguchi H, Matsuda T, Asoh K, Van Damme J, Welgus HG, Kuwano M. (1989) Effects of tumor necrosis factor and epidermal growth factor on cell morphology, cell surface receptors, and the production of tissue inhibitor of metalloproteinases and IL-6 in human microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 143(5):1619-27.
- McMahon GA, Garfinkel S, Prudovsky I, Hu X, Maciag T. (1997) Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J Biol Chem.* 272(45):28202-5.
- Miossec P. (2002) Anti-interleukin 1alpha autoantibodies. *Ann Rheum Dis.* 61(7):577-9.
- Mohan SK, Yu C. (2011) The IL1alpha-S100A13 heterotetrameric complex structure: a component in the non-classical pathway for interleukin 1alpha secretion. *J Biol Chem.* 286(16):14608-17.
- Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK. (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem.* 262(7):2941-4.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP. (2008) The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 3(10):e3331.
- Nibbs RJ, Graham GJ. (2003) CCL27/PESKY: a novel paradigm for chemokine function. *Expert Opin Biol Ther.* 3(1):15-22.
- Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. (1998) The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics.* 51(1):161-3.

- Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol.* 11(11):1014-22.
- Osterreicher J, Skopek J, Jahns J, Hildebrandt G, Psutka J, Vilasová Z, Tanner JM, Vogt J, Butz T. (2003) Beta1-integrin and IL-1alpha expression as bystander effect of medium from irradiated cells: the pilot study. *Acta Histochem.* 105(3):223-30.
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Henzel WJ, Vandlen R. (2001) IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine.* 13(1):1-7.
- Perlstein RS, Mehta NR, Mougey EH, Whitnall MH, Neta R. (1995) Whole-body irradiation transiently diminishes the adrenocorticotropin response to recombinant human interleukin-1 alpha. *Radiat Res.* 141(3):336-41.
- Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. (2008) High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 10(3):209.
- Pollock AS, Turck J, Lovett DH. (2003) The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *FASEB J.* 17(2):203-13.
- Re RN. (2003) The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *Bioessays.* 25(4):401-9.
- Re RN, Cook JL. (2006) The intracrine hypothesis: an update. *Regul Pept.* 133(1-3):1-9.
- Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. (2008) Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 9(10):1006-12.
- Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzone M, Dumitriu IE, Müller S, Iannacone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA. (2004) HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 5(8):825-30.

- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. (2007) IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 117(6):1538-49.
- Saurat JH, Schifferli J, Steiger G, Dayer JM, Didierjean L. (1991) Anti-interleukin-1 alpha autoantibodies in humans: characterization, isotype distribution, and receptor-binding inhibition--higher frequency in Schnitzler's syndrome (urticaria and macroglobulinemia). *J Allergy Clin Immunol.* 88(2):244-56.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418(6894):191-5. Erratum in: (2010) *Nature.* 467(7315):622.
- Sharma S, Kulk N, Nold MF, Gräf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P. (2008) The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 180(8):5477-82.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. (2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 23(5):479-90.
- Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. (1997) The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol.* 37(1):64-72.
- Sims JE, Smith DE. (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 10(2):89-102.
- Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH. (1993) The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(15):7245-9.
- Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH. (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(2):508-13.
- Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims JE. (2002) Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics.* 79(5):726-33.

Vicenová B: Po stopách interleukinu-1 α . Diplomová práce, Praha 2005.

Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. (2004) The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(8):2434-9.

Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T. (1993) Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 α precursor. *J Biol Chem*. 268(29):22100-4.

Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L. (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 α N-terminal binding protein. *Cytokine*. 15(3):122-37.

Zhang Y, Kornfeld H, Cruikshank WW, Kim S, Reardon CC, Center DM. (2001) Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16. *J Biol Chem*. 276(2):1299-303.

Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ. (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct Mol Biol*. 14(11):1070-6.

Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC. (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*. 251(4989):90-3.