

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**katedra biochemických věd**

**Primární interakce B buňky s intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* LVS**

diplomová práce

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Zuzana Kročová, PhD**

**Hradec Králové, 2006**

**Dagmar Součková**

Obsah.....	2
Seznam zkratek.....	3
Úvod.....	5
1. Teoretická část.....	6
1.1. Charakteristika imunitní odpovědi B lymfocytů.....	6
1.2. Interakce B buněk s mikrobiálními komponentami.....	7
1.3. <i>Francisella tularensis</i> a tularémie.....	7
1.3.1. Tularémie.....	7
1.3.2. <i>Francisella tularensis</i> .....	8
1.3.3. <i>Francisella tularensis</i> LVS jako model studia.....	9
1.4. Imunitní reakce po infekci <i>Francisella tularensis</i> .....	9
1.5. Interakce bakterie <i>F. tularensis</i> s hostitelskými buňkami.....	9
1.5.1. Fagocytóza.....	9
1.5.2. Intracelulární lokalizace bakterie.....	10
1.5.3. Cytopatogenní efekt.....	11
1.5.4. Virulentní faktory a jejich regulace.....	11
1.5.5. Signální cesty po infekci makrofágů.....	11
1.6. Úloha B buněk v průběhu infekce <i>Francisella tularensis</i> .....	12
2. Experimentální část.....	13
2.1. Použitý materiál.....	13
2.1.1. Buněčné linie, bakterie.....	13
2.1.2. Média, roztoky, chemikálie a primery.....	13
2.1.3. Přístroje a pomůcky.....	15
2.2. Pracovní postup.....	17
2.2.1. Rozmražení a pasážování buněčné linie A20 a Ramos.....	17
2.2.2. Stanovení celkového počtu buněk a životnosti.....	17
2.2.3. Infekce B buněčné linie A20 a Ramos <i>F. tularensis</i> pro transmisní elektronovou mikroskopií (TEM).....	19
2.2.4. Detekce exprese genů buněk A20 po infekci metodou RT-PCR.....	21
3. Výsledky.....	27
3.1. Infekce buněk Ramos a A20 pro TEM.....	27
3.2. Metoda RT-PCR.....	34
4. Diskuse.....	39
5. Závěr.....	46
6. Použitá literatura.....	47

## Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňky
BCR	receptor lymfocytů B pro antigen
BLP	lipopeptidy
BKO	myši deficitní na B buňky
CD	diferenční antigen
CFU	počet jednotek tvořících kolonie (colony forming unite)
CR	komplementový receptor
DEPC	diethylen karboxyl
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
i.d.	intradermální podání
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleukiny
iNOS	inducibilní NO-syntáza
i.p.	intraperitoneální podání
i.v.	intravenózní podání
LAMP	lysosomal-associated membrane protein
LD <sub>50</sub>	dávka letální pro 50% jedinců z vyšetřované skupiny
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogenem aktivované protein kinázy
MHC II	histokompatibilní systém II třídy
MOI	multiplicita infekce
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NH <sub>4</sub> Cl	chlorid amonný
O.D.	optická denzita
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
RANTES	cytokin s funkcí chemokinu
ROI	reaktivní kyslíkové intermediáty
RT-PCR	reverzní polymerázová řetězová reakce
s.c.	subkutánní podání

SCID	těžký kombinovaný imunodeficit
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor
T <sub>H</sub> 1, 2	pomocné T lymfocyty
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
TLR	toll like receptory

## Úvod

Cílem mojí diplomové práce bylo zjistit, jestli dochází k přímé interakci mezi B buňkami a intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* LVS v podmínkách *in vitro* a jakým způsobem B lymfocyty na tuto interakci reagují. B lymfocyty jsou pro svoji schopnost produkovat specifické protilátky řazeny především mezi složky adaptivní imunitní reakce. Úloha B buněk v přirozené imunitní odpovědi, přesto, že je v poslední době intenzivně studována, není doposud objasněna. To bylo důvodem, proč jsme se právě touto otázkou v diplomové práci zabývali. Přímou interakci jsme studovali pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Podařilo se nám detekovat nejen bakterie adherované na buněčném povrchu, ale dokonce bakterie buňkami pohlcené. Metodou RT-PCR jsme u B buněk, které byly infikovány, popřípadě stimulovány bakteriálním LPS, detekovali změny v expresi genů pro cytokiny, receptor TLR4, aktivační faktor c-Rel a enzym NO-syntázu.

# 1. Teoretická část

## 1.1. Charakteristika imunitní odpovědi B lymfocytů

B lymfocyty se diferencují z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Panenské B buňky pronikají do krevního řečiště a cirkulují mezi folikuly periferních lymfatických orgánů (slezina a lymfatické uzliny). Na svém povrchu nesou kromě jiných i membránové receptory pro antigeny. Receptory mají molekulu strukturně podobnou produkovaným imunoglobulinům třídy IgM a IgD a jsou ukotveny do cytoplazmatické membrány. Cytoplazmatický konec se skládá ze třech aminokyselin (valin, valin a lysin). Tento aminokyselinový úsek je příliš krátký k přenosu signálu do buňky, proto jsou k receptoru přidruženy ještě krátké aminokyselinové úseky Ig $\alpha$  a Ig $\beta$ , které signál zesilují. Dohromady s membránovým imunoglobulinem tvoří B buněčný receptorový komplex (BCR).

Navázání nativního antigenu na BCR komplex aktivuje složitý systém signálních kaskád, které indukují expresi genů, jejichž produkty způsobují proliferaci a diferenciaci panenských B buněk do plazmatických buněk. Vznikají klony antigen specifických buněk se zvýšenou expresí hlavního histokompatibilního systému II třídy (MHC II) a povrchových receptorů pro cytokiny.

U B lymfocytů je popsána antigen prezentující funkce, která je ovšem mnohem slabší než u profesionálních fagocytů jakými jsou makrofágy a dendritické buňky. Pohlcený antigen je v endosomu enzymaticky rozštěpen a vzniklé peptidové fragmenty jsou v komplexu s MHC II třídy na povrchu prezentovány pomocným T lymfocytům (CD4+). CD4 pozitivní buňky jsou schopny receptorově rozpoznat komplex MHC II molekuly s peptidovým fragmentem společně s ostatními kostimulačními molekulami (CD40, B7-1 a B7-2) na B buňkách. Po navázání CD4+ na tyto molekuly dochází k jejich aktivaci a produkci cytokinů, které jsou nutné pro zesílení imunitní odpovědi B buněk. T buňkami jsou produkovány tři hlavní interleukiny (IL), IL-4, IL-5 a IL-6, které zvyšují B buněčnou proliferaci. Diferenciace do plazmatických buněk je ovlivňována IL-6, jehož zdrojem jsou nejen T buňky ale i makrofágy. Plazmatické buňky migrují do kostní dřene, která se tak stává hlavním místem produkce protilátek (1).

Při primární fázi protilátkové odpovědi vznikají výhradně pentamerní IgM, které mají poměrně nízkou afinitu k antigenu, ale účinně blokují šíření infekce tvorbou imunokomplexů. V sekundární fázi dochází ke zvýšení afinity protilátek a především k izotypovému přesmyku, tj. místo původních IgM se začínají tvořit jiné izotypy. Tyto změny jsou regulovány

prostřednictvím cytokinů uvolňovaných z aktivovaných CD4 pozitivních buněk a dalších buněk např. interferon gama (IFN- $\gamma$ ) indukuje tvorbu podtříd IgG1 nebo IgG3, IL-4 podporuje tvorbu IgE proti parazitárním infekcím (1).

Některé aktivované B buňky, nazývané paměťové buňky, nabývají schopnost dlouhodobého přežití a jsou schopné zareagovat na opětovnou infekci mnohem rychleji a efektivněji (1).

## 1.2. Interakce B buněk s mikrobiálními komponentami

Na povrchu buněk je množství receptorů rozpoznávajících různé mikrobiální molekuly jako peptidoglykany, bakteriální RNA nebo DNA a lipopolysacharidy (LPS). LPS jsou integrální komponentou vnější buněčné membrány Gram negativních bakterií. Tyto endotoxiny jsou z mikroorganismů uvolňovány při jejich růstu nebo usmrcení. Během infekce jsou rozpoznány imunitním systémem a působí jako imunogen. LPS molekuly se navazují na membránové TLR4 receptory (toll-like receptors), které se nacházejí kromě B lymfocytů i na jiných typech imunitních buněk. B buňky navíc exprimují pro ně specifický receptor RP105 (CD180), který LPS rozeznává (2).

Všechny LPS se skládají ze dvou částí, O-řetězce a lipidu A, které se liší strukturním a chemickým složením v závislosti na kmenu bakterie. Kmeny *Brucella abortus* a *B. melitensis* mají rozdílné složení O polysacharidových řetězců a totožné části lipidu A. LPS z kmene *Brucella melitensis* jsou pohlceny, ale jejich peptidové fragmenty se nenačepují na MHC II třídy. Naopak u příbuzného kmene *B. abortus* je prokazatelné, že peptidové fragmenty tvoří komplex s molekulami MHC II třídy, který se dostává na povrch buňky. Schopnost vytvořit komplex s MHC II třídy je závislá na složení O-řetězce (3).

## 1.3. *Francisella tularensis* a tularémie

### 1.3.1. Tularémie

První zaznamenaná epidemie tularémie je z roku 1911. Objevila se v kalifornském městečku Tulare a zasáhla převážně hlodavce. Za původce epidemie byla označena gramnegativní bakterie, kterou izoloval McCoy. McCoy ve spolupráci s Chapinem mikroba nejen vyizolovali, ale pojmenovali ho podle místa prvního nálezu *Bakterium tularensis*. Konečně v roce 1921 bakterii izoloval E. Francis z lidského hnisu a pojmenoval tuto chorobu tularémie. Následně se na jeho počest bakterie pojmenovala *Francisella tularensis*. Tularémie se vyskytuje převážně v Severní Americe, Japonsku, Rusku a celé Skandinávii. Výskyt byl

zaznamenán i v jižnějších oblastech Evropy, ve Španělsku, Turecku a na Balkánském poloostrově.

Člověk se může infikovat manipulací s nakaženým zvířetem, pobodáním hmyzem a kousnutím klíštěte nebo požitím kontaminované vody. Klinické projevy závisí na infekční dávce a cestě vstupu do lidského organismu. Branou vstupu může být poškozená pokožka (ulceroglandulární forma), spojivkový vak (okuloglandulární forma) a dýchací nebo zažívací trakt (plicní forma a tyfová forma). Inkubační období je zpravidla 3 – 6 dní následně se objevují chřipkové příznaky a otoky lymfatických uzlin.

Terapie je založena na podávání antibiotik ze skupiny aminoglykosidů (streptomycinu, gentamycinu nebo spiramycinu). Rekonvalescence je komplikovaná a dlouhodobá a je doprovázena neurovegetativními potížemi.

Dobré podmínky pro výskyt tularémie u nás poskytují oblasti jižní Moravy a Polabí. Ročně je nahlášeno přibližně 50 až 250 nových případů (4).

### 1.3.2. *Francisella tularensis*

*Francisella tularensis* je intracelulární patogen způsobující tularémii. Tato bakterie pro svou vysokou virulenci, velmi snadné šíření a schopnost způsobovat poměrně těžká onemocnění je zařazena do kategorie A bojových biologických agens. Do stejné skupiny jsou řazeny *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum* toxin, *Variola major* a virové hemoragické horečky (filoviry Ebola, Marburg).

*Francisella tularensis* je drobná gramnegativní nepohyblivá, striktně aerobní, nesporulující tyčka o rozměrech 0,7 x 0,2 µm.

Taxonomické zařazení *F. tularensis* se velmi často měnilo. V roce 1947 byl založen samostatný druh nazývaný *Francisella*. Podle virulence a geografického rozšíření jsou rozdělovány čtyři podruhy *F. tularensis*. *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* se vyskytuje v oblastech Severní Ameriky a je vysoce virulentní k člověku i hospodářským zvířatům. *F. tularensis* subspecies *holarctica* způsobuje mírné formy onemocnění. Mortalita u kožní nákazy člověka je méně než 0,5%. Její výskyt převažuje v Evropě. *F. tularensis* subspecies *mediaasiatica* byla izolována v asijských státech a bývalém SSSR. Je prokazatelně méně virulentní než subspecies *tularensis*. *F. tularensis* subspecies *novicida* se účastní u nálezů prostřednictvím kontaminované vody. Prokazuje virulenci na úrovni subspecies *holarctica* a *mediaasiatica* (4).



### 1.3.3. *Francisella tularensis* kmen LVS jako model studia

LVS má oslabenou virulenci pro člověka, ale u myší způsobuje smrtelnou infekci., která se histopatologicky podobá lidské tularémii. Pro tyto vlastnosti je kmen LVS velmi atraktivní pro laboratorní výzkum, kdy pomáhá zlepšit obecné pochopení imunologie a patogeneze u intracelulárních patogenů. Letální dávka LVS myším způsobuje patrné patologické procesy na myších játrech a slezině s degradací architektury orgánů naopak infikované plíce nevykazují výraznější patologické změny tkáně (5).

### 1.4. Imunitní reakce po infekci *F. tularensis*

Primárním cílem *F. tularensis* je makrofág. Infikované imunitní buňky infiltrují do retikuloendoteliálního systému, kde indukují vylučování tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- $\alpha$ ) a IFN- $\gamma$  a dalších cytokinů do systému. Ty jsou nutné pro kontrolu infekce v prvních hodinách a aktivují expanzi T buněčné odpovědi (4).

Specifická protilátkami zprostředkovaná odpověď má obecně nižší efektivitu v průběhu infekce intracelulárními patogeny. Tvorba specifických anti-*Francisella* protilátek může znamenat určitou výhodu převážně při expozici nízkým dávkám (5).

### 1.5. Interakce bakterie *Francisella tularensis* s hostitelskými buňkami

*Francisella tularensis* je intracelulárním patogenem, který je schopný se pomnožovat v různých typech eukaryotních buněk. Patří k nim kromě jiných hepatocyty a endotelové buňky a především již zmíněné makrofágy, které můžeme označit za primární cíl (4). Z těchto důvodů jsou na většinu pokusů s *F. tularensis* prováděných *in vitro* používány právě monocyto-makrofágové buněčné linie. *F. tularensis* dokáže přežít a replikovat se v aměbě *Acanthamoebae castellani*, proto prvoky (protozoa) považujeme za významný reservoár infekce (6).

#### 1.5.1. Fagocytóza

Při vstupu *F. tularensis* LVS do makrofágu je bakterie obklopena dlouhými, asymetrickými smyčkami pseudopodií a vtažena do buňky. Jedná se odlišný způsob pohlcení na rozdíl od jiných bakterií například *Salmonella enteritica*, *Salmonella flexneri*, které vstupují konvenční fagocytózou, při které jsou pseudopodie cytoplazmy menší a symetrické. Pohlcení bakterií pomocí asymetrických dlouhých smyček bylo prokázáno u bakterií *F. tularensis* usmrcených formalinem i 30-ti minutovým varem. Avšak krátkodobé působení 1% kyseliny peroctové na

bakterii vede k jejímu vstupu do makrofágu pouze konvenční fagocytózou. Vysvětlením je pravděpodobná oxidace karbohydrátových skupin bakteriálního pouzdra a molekul LPS .

Makrofág potřebuje k provedení funkční fagocytózy účast aktinových mikrofilament. *F. tularensis* po inkubaci s lidskými makrofágy v přítomnosti cytochalazinu B ve většině pouze adherovala na povrch buňky. Cytochalazin B totiž působí jako inhibitor aktinových mikrofilament a potvrzuje jejich potřebu pro funkci fagocytózy (7).

Přesné, receptorem zprostředkované mechanismy vstupu do buňky nejsou známy, ale byla potvrzena úloha komplementových receptorů CD11b a CD18. CD11b je součástí receptoru pro CR3 a podobně CD18 tvoří část receptorů pro CR3 a CR4 (7).

### 1.5.2. Intracelulární lokalizace bakterie

Primárním baktericidním mechanismem lidských a myších makrofágů je splynutí fagozomu s primárním lysozomem a jeho cidními látkami a enzymy. Během prvních hodin po pohlcení se bakterie vyskytují společně s endozomálním markrem glykoproteinem LAMP-1 ve fagozomu, ale po třech hodinách jejich společný výskyt klesá na 30%. Elektronová mikroskopie dokazuje, že se bakterie vyskytují volně v cytoplazmě nebo jsou obklopeny již narušenou fagozomální membránou. Mechanismus úniku není přesně znám (8). Předpokládá se, že je zprostředkován uvolněním rozličných proteinů ze zfagocytovaných bakterií. Pro studium mechanismů interakce *F. tularensis* LVS a zjišťování jejich virulentních faktorů byly připraveny různé mutanty. Jedním z nich je mutant *F. tularensis* LVS  $\Delta$ iglC s deletovaným genem, který kóduje 23 kDa protein. Po proběhlé fagocytóze mutanty  $\Delta$ iglC zůstávají velmi dlouho, na rozdíl od *F. tularensis* LVS, v intaktním fagozomu. Dalším pozorovaným jevem při infekci makrofágu J774 je neschopnost mutanty  $\Delta$ iglC se výrazněji multiplikovat (9).

Pro multiplikaci patogenu v buňkách je nutné kyselé prostředí fagozomu, ve kterém je uvolňováno železo. Železo je nezbytný nutrient pro *F. tularensis*. Pokud byly použity blokátory acidifikace, chloroquin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nebo ouabain došlo k snížení multiplikace bakterií uvnitř buněk (10).

Některé ostatní intracelulární bakterie jako *Listeria*, *Shigella* nebo *Rickettsia* mohou obdobně uniknout z fagozomu a replikovat se v cytoplazmě infikovaných buněk. *L. monocytogenes* produkuje charakteristické proteiny perforující membránu lysteriolysin, fosfolipásu C, A a fosfolipásu B (8).

### 1.5.3. Cytopatogenní efekt

Intracelulární přítomnost a multiplikace *F. tularensis* kmenu LVS způsobuje cytopatogenní efekt u myší monocyto –makrofágové buněčné linie (11,12).

Během prvních 10-ti hodin po infekci je u infikovaných makrofágů indukována apoptóza. V dalších intervalech po 24 a 40-ti hodinách dramaticky vzrůstají počty makrofágů, které vykazují známky nekrózy (11). Cytopatogenní efekt vykazuje závislost na multiplicitě infekce (MOI). MOI vyjadřuje orientační počet bakterií na jednu buňku při infekci *in vitro*. Čím vyšších hodnot MOI při pokusu nabývá, tím větší množství buněk umírá v daném časovém intervalu (12).

### 1.5.4. Virulentní faktory a jejich regulace

Za primární mechanismus patogeneze *F.tularensis* je považována její schopnost replikace v makrofázích *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Molekulární podstata tohoto děje však není úplně objasněna. Pro virulenci a přežití v makrofágu jsou nutné některé bakteriální geny resp. jejich proteinové produkty. Mezi nejdůležitější geny jsou zařazeny *mglA* a *iglC* (6). Gen *mglA*, lokalizovaný v operonu *mglAB* (13) kóduje protein MglA, který je považován za globální regulátor transkripce mnoha dalších genů důležitých pro virulenci, mezi které řadíme geny *pdpD*, *iglA*, *iglC*, *iglD* a *pdpA*. Ty se nacházejí v oblasti genomu nazývaného ostrov patogenity (30 Kb) a jsou přítomny u kmene *novicida* pouze v jedné kopii a naopak u kmene LVS duplicitně. Jejich expresí vznikají rozmanité proteiny PdpA a PdpD, které jsou potřeba pro intracelulární replikaci. Operon *iglABCD* kóduje proteiny IglA a IglB u nichž se předpokládá, že ovlivňují sekreci proteinů. Regulace signálů přenášených přes TLR4 receptory do buňky je pravděpodobně řízena působením proteinu IglC (13).

### 1.5.5. Signální cesty po infekci makrofágů

Mikrobiální LPS a lipoproteiny vazbou na TLR receptory makrofágů (Toll-like receptory) přispívají k sekreci zánětlivých cytokinů a aktivaci antimikrobních procesů. Regulace těchto hostitelských obranných mechanismů závisí na intracelulárních signálních cestách. Hlavním cílem přenosu signálu jsou systémy nukleárního faktoru kappa B (NF-κB) a mitogen aktivované protein kinázy (MAPK). *F. tularensis* blokuje TLR receptorem zprostředkovanou aktivaci signálních cest a sekreci TNF-α a IL-1. Buňky infikované *F. tularensis* LVS tudíž nejsou schopné zahájit produkci cytokinů ani po podání stimulačních lipopeptidů (BLP) a *E. coli* LPS (14).

*F. tularensis* LVS indukuje v makrofázích apoptózu a nekrózu prostřednictvím aktivace p42/p44 MAPK signálních cest za současné inhibice anti-apoptické funkce p38 MAPK (11). Makrofágová mikrobicidní funkce je způsobena uvolněním mikrobicidních látek (dusíkové a kyslíkové intermediáty) do fagozomu. Po úniku virulentní bakterie do cytosolu jsou obranné mechanismy méně prozkoumány. Přítomnosti mikrobiálních komponent v cytosolu se aktivuje specifická kaskáda nazývaná cytosolický proteinový komplex jehož hlavními součástmi jsou kaspázy. Za nejdůležitější z nich je považována kaspáza-1. Jedná se o cysteinovou proteázu, která je u infikovaných buněk aktivována autokatalytickou přeměnou jejího 45kD zymogenu, ze kterého se odštěpuje proteinový úsek p10. Kaspáza-1 signalizuje buněčnou smrt a reguluje dozrávání prozánětlivých cytokinů pro-IL-1 $\beta$  a pro-IL-18 do aktivní formy IL-1 $\beta$  a IL-18 (15).

### 1.6. Úloha B buněk v průběhu infekce *F. tularensis*

Pokusy Karen Elkins poukazují na rychlý rozvoj imunitní odpovědi ve skupině pokusných myší C57BL/6J po podání dávky *F. tularensis* LVS. Imunizace zdravých jedinců proběhne po první subkutánní (s.c.) nebo intradermální (i.d.) aplikaci LVS a poskytuje pokusným zvířatům již během 3 dnů obranu proti sekundární dávce LVS podané intraperitoneálně (i.p.) nebo intravenózně (i.v.). Myši, které nebyly imunizovány, jsou po podání LVS značně citlivé a hynou brzy po i.p. infekci. Mají nízkou 50% letální dávku (LD<sub>50</sub>), kterou představují jen 2 bakterie LVS. Hodnoty LD<sub>50</sub> u imunizovaných myší jsou o poznání vyšší a dosahují až 3 x 10<sup>6</sup> bakterií. Vyvstala otázka, jaké mechanismy a buňky se uplatňují na rozvoji imunitní reakce (16,17).

Následující pokusy Karen Elkins se soustředili na roli B buněk. Myši s absencí B buněk v periferii (BKO myši) mají nízkou schopnost zareagovat na sekundární letální infekci LVS. Nedostatečně se imunizují a hynou, protože nedokáží patogeny zcela eliminovat jako je tomu u zdravých jedinců. Přenos B buněk do BKO jedinců zřetelně zvyšuje jejich odolnost proti infekci a zvyšuje přežití (18). Provedením dalších pokusů na scid (deficitní T a B lymfocyty) a atymických *nu/nu* myších (chybí T lymfocyty) se potvrdila závislost imunitní odpovědi na B buňkách (19).

Stále nejasnou úlohu mají B buňkami vylučované specifické protilátky. Karen Elkins zjistila, že přenos specifických protilátek BKO myším nevede k rozvoji obrany před infekcí LVS zatímco tým Stephana Stenmarka (20) dospěl k opačným závěrům.

## 2. Experimentální část

### 2.1. Použitý materiál

#### 2.1.1. Buněčné linie, bakterie

Myší B-buněčná linie A20 (ATCC TIB-208), která má genetické pozadí myší BALB/c AnN, je IgG+, Ia+, Fc+, IgM-, IgA- a komplementový receptor negativní, prezentuje jak alloantigeny, tak proteinové antigeny T buňkám pomocí MHC komplexu.

Lidská lymfocytární B-buněčné linie Ramos (ATCC CRL-1596), která je negativní na virus Epstein-Barrové, má receptor pro IL-4, nízkou afinitu k tvorbě IgE a secernuje IgM.

Bakterie *Francisella tularensis* kmen LVS/M

#### 2.1.2. Média, roztoky, chemikálie, primery

Kultivační médium Dullbeco (with glutamax) + 10% FCS

LPS (*E.coli*) – zásobní roztok 1mg/1ml PBS

LPS (*F. tularensis*) – zásobní roztok 1mg/1ml (Univerzita Úmea, Švédsko)

Pufrovaný fyziologický roztok -PBS sterilizovaný

DEPC – diethylen karboxyl k.č. D-5758

Ethidium bromid pro PCR - zásobní roztok 10mg/ml (Sigma) kat.č. 214-984-6, připravit roztok 2µg/ml: 150µl zásobního roztoku a 750ml deionizované vody

Agarosa ultra Pure pro PCR (Gibco) kat. č. 15510 - 027

Trizol (Gibco) č.š. 1063360

Isopropylalkohol p.a. (Penta) č.š. 040504

Chloroform p.a. (Lachema) kat.č. 22-38-40-48/20/22

0,5x TBE purf, připravit z 5x koncentrovaného roztoku TBE

Kultivační pevné půdy Mc Leod

0,5% roztok trypanové modři v PBS

Fixační pufr pro TEM (2,5% glutaraldehyd v 0,1M kakodylátovém pufru)

### **Chemikálie pro RT-PCR :**

Random Primers (Invitrogen) kat.č. 48190-011

5x first Strand buffer (Invitrogen) kat.č. Y00 146

DTT 0,1M [1,4-dithio-DL-threitol] (Invitrogen) kat.č. Y00 147

RNasin inhibitor Rnáz (Invitrogen) kat.č. 10777-019

Acidický BSA-zásobní roztok 10mg/ml (Promega,USA) kat.č. 9513 114L

dNTP (10mM/base) – směs připravit z 10 $\mu$ l od každého roztoku nukleotidu a doplnit 60 $\mu$ l DEPC, 100 $\mu$ M dTTP (Invitrogen) kat.č. 10219-012, 100mM dATP (Invitrogen) kat.č. 10216-018, 100mM dCTP (Invitrogen) kat.č. 10217-016, 100mM dGTP (Invitrogen) kat.č. 10218-014

SuperScript II RT- reverzní transkriptáza (Invitrogen) kat.č. 18064-014

10x PCR Rxn Buffer (Invitrogen) kat.č. Y02028

MgCl<sub>2</sub> 25mM (Invitrogen) kat.č. Y02016

Taq polymerasa (MBI Fermentas)

1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) kat.č. 10787-018

### **Primery pro RT PCR:**

$\beta$ -aktin (Invitrogen)

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

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

IL-1 $\beta$  (Invitrogen)

S: 5'- ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T – 3'

AS: 5'- CA GGA CAG GTA TAG ATT CTT TCC TTT – 3'

IFN- $\alpha$  (Generi-biotech)

S: 5'- GAT TCA TCT GCT GCT TGG AAT GCA ACC CTC – 3'

AS: 5'- GAT TCA CTC CTT CTC CTC ACT CAG TCT TGC C – 3'

IL-12 (Invitrogen)

S: 5'- CAG AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT - 3'  
AS: 5'- TCC GGA GTA ATT TGG TGC TTC ACA - 3'

IL-6 (Generi-biotech)

S: 5'- ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T - 3'  
AS: 5'- CA CTA GGT TTG CCG AGT AGA TCT C - 3'

IFN- $\gamma$  (Invitrogen)

S: 5'- GAA AGC CTA GAA AGT CTG AAT AAC T - 3'  
AS: 5'- ATC AGC AGC GAC TCC TTT TCC GCT T - 3'

TGF- $\beta$  (Invitrogen)

S: 5'- CTC CCA CTC CCG TGG CTT CTA G - 3'  
AS: 5'- G TTC CAC ATG TTG CTC CAC ACT TG - 3'

IL-17 (Generi-biotech)

S: 5'- GGT CAA CCT CAA AGT CTT TAA CTC - 3'  
AS: 5'- TTA AAA ATG CAA GTA AGT TTG CTG - 3'

IL-10 (Invitrogen)

S: 5'- ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA - 3'  
AS: 5'- CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A - 3'

iNOS (Invitrogen)

S: 5'- CTC ACT GGG ACA GCA CAG AA - 3'  
AS: 5'- GTG CTG TGC TAC AGT TCC GA - 3'

TLR4 (Generi-biotech)

S: 5'- GCA ATG TCT CTG GCA GGT GTA - 3'  
AS: 5'- CAA GGC ATA AGA ACG CTG AGA - 3'

c-Rel (Generi-biotech)

S: 5'- GCT CCA AT ACT GCA GAA TTA AGG - 3'  
AS: 5'- CGT GCA GAT ATC TAA AAT CCA TAG - 3'

### 2.1.3. Přístroje a pomůcky

Mikroskop světelný binokulární (Amplival)

Mikroskop inverzní IDM (Meopta)

Počítací komůrka podle Bürkera (Meopta)

Třepačky MS2

Termocykler GeneAmp 9700

Elektroforetická vana Mupid (Cosmo bio co.)

Spektrofotometr (Helios), kyvety (Scholler)

Centrifuga BR4i

Ultracentrifuga Biofuge (Heraeus)

Flow box BioAir

Denzitometr, WPA Biowave

Osobní počítač – Microsoft Office

Automatické pipety (Eppendorf, BioHit), 10,100 a 1000 $\mu$ l špičky (Eppendorf)

Latexové rukavice (Hartmann), zkumavky, kádinky, bakteriální kličky

24 jamkové panely na infekci



## 2.2. Pracovní postup

### 2.2.1. Rozmražení a pasážování buněčné linie A20, Ramos

Kryo zkumavku s buňkami jsme opatrně vyňali z mrazícího boxu s kapalným dusíkem. Rozpustili obsah zkumavky ve vodní lázni nebo mnutím ve dlani tak, aby k rozpuštění došlo maximálně do 2 minut. Ve sterilním boxu jsme rozmražený obsah velmi rychle přenesli automatickou pipetou do sterilní zkumavky s malým množstvím média. Zkumavku jsme zcentrifugovali při 1200g po dobu 5minut. Důvodem centrifugace byla nutnost odstranění média, které obsahuje pro buňky jedovaté kryoprotektivum dimethylsulfoxid. Supernatant jsme opatrně odsáli a zbylé pelety roztřepali v malém množství přidaného čistého média. Získanou buněčnou suspenzi jsme převedli do kultivační láhve s plochou dna 25 cm<sup>2</sup> s 10 ml kultivačního media. Kultivační láhev jsme přenesli do termostatu, kde jsme ji pootevřenou kultivovali při 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 hodinách kultivace jsme provedli odběr a měřili životnost buněk. Při pasážování buněk (každé 2-3 dny) jsem narostlou buněčnou kulturu pečlivě zkontrolovali pod inverzním mikroskopem IDM (Meopta). Zhodnotili jsme její morfologii, buněčnou hustotu a čistotu média. Teprve ve sterilním boxu jsme láhev protřepali popř. použili škrabku na uvolnění adherovaných buněk (škrabeme v médiu). Z kultivační láhve jsme odebrali 10μl buněčné suspenze na stanovení životnosti a počtu buněk. Podle kapitoly 2.2.2. (příklad 1) jsme vypočítali množství buněk na 1 ml suspenze a podle potřeby naředili kultivačním médiem.

### 2.2.2. Stanovení celkového počtu buněk a životnosti

Celkový počet buněk v suspenzi jsme zjistili pomocí počítací Bürkerovy komůrky. Z buněčné suspenze jsme asepticky odebrali 10μl a smíchali s 10μl Trypanové modři (pracovali jsme v rukavicích, protože Trypanová modř je toxická). Směs jsme pipetou aplikovali pod sklíčko u Bürkerovy komůrky a pod světelným mikroskopem Amplival spočítali dvakrát 25 čtverců (sčítali jsme buňky umístěné uvnitř čtverce a přičítali i ty umístěné na obvodu dvou vybraných stran). Ze dvou získaných součtů jsme vypočítali počet buněk v 1 ml suspenze následujícím způsobem.



### 2.2.3. Infekce B buněčné linie A20 a Ramos *F. tularensis* pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

50/ ml v kultivačním médiu

#### PRINCIP TEM

Využitelná rozlišovací schopnost elektronového mikroskopu je asi tisícinásobně vyšší, než je u světelného mikroskopu. Při studiu biologických materiálů je kolem 2 nm. Zdrojem záření v elektronovém mikroskopu je wolframové vlákno vysílající pod vysokým napětím elektrony. Jejich průběh ve vakuovaném tubusu ve formě lineárního svazku je elektromagneticky usměrňován. Kondenzor soustředí svazek elektronů na vyšetřovaný objekt pro jeho optimální zobrazení na stínítku a snímkování. Osvětlená část vzorku je zvětšována systémem tvořeným objektivem a projekтивem. Zaostřování obrazu se děje proměnami účinné ohniskové délky elektromagnetických čoček objektivu změnou proudu. Projekční čočka zobrazuje zvětšený obraz na fosforeskujícím stínítku, které po ozáření elektrony emituje světlo ve viditelné oblasti. Černobílý obraz viditelný na stínítku je možné registrovat fotograficky.

#### PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE *F. TULARENSIS* LVS

Den před pokusem jsme ze štoky masivně vyseli bakterie *F. tularensis* LVS na 3 plotny McLeod a kultivovali při 37°C. Z naočkovaných bakterií jsme připravili suspenzi v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) o přesném O.D. 0,97, kterou jsme změřili na denzitometru WPA značky Biowave. Bakteriální suspenzi jsme rozplnili po 1 ml do zkumavek s víčkem (Eppendorf) a zcentrifugovali při 4800ot po dobu 7 minut. Získané pelety jsme resuspendovali ve 100μl kultivačního média Dullbeco (přibližně  $5 \times 10^9$  bakterií/ 100μl) a důkladně promíchali. Zkumavky jsme do upotřebení ponechávali na ledu.

#### KONCENTRACE BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE

Z bakteriální suspenze v PBS jsme odebrali 50μl a zředili desítkovou řadou na koncentraci  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  a 50μl této suspenze vyseli duplicitně na plotny McLeod. Po 72 hodinách kultivace v inkubátoru jsme počítali CFU pro zjištění koncentrace CFU/ml. Výpočet jsme provedli podle následujícího vzorce.

Vzorec 1:                    počet kolonií X ředění 1 X ředění 2 = CFU/ml  
                                 ředění 1.....1000μl /50μl  
                                 ředění 2.....převrácená hodnota koncentrace

Skutečná koncentrace bakteriální suspenze u buněčné linie A20 je:  $4,28 \times 10^{10}$  CFU/ ml

Skutečná koncentrace bakteriální suspenze u buněčné linie Ramos je:  $2,23 \times 10^9$  CFU / ml

## PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ SUSPENZE

Namnožené buněčné linie A20 a Ramos jsme naředili na  $1 \times 10^7$  bb/ ml v kultivačním médiu (Dullbeco + 10% sérum, bez gentamycinu).

## INFEKCE

Pracovali jsme ve 24 jamkovém panelu. Do jamek jsme napipetovali  $1 \times 10^7$  bb/ ml v kultivačním médiu (Dullbeco + 10% sérum, bez gentamycinu) a podle výsledků výpočtu jsme přidali 100 $\mu$ l připravené bakteriální suspenze v médiu o MOI 500.

**Výpočet:** O.D. = 0,97

1 jamka  $1 \times 10^7$  ..... potřeba  $5 \times 10^9$  bakterií / 1 jamku

MOI = 500 (500 bakterií na 1 buňku)

$$5 \cdot 10^9 / 5 \cdot 10^9 = X / 100$$

**X = 100 $\mu$ l média s bakteriemi**

## Postup:

1. inkubovat 6, 12, a 24 hodin v CO<sub>2</sub> inkubátoru
2. v intervalu buňky 2 x promýt v PBS (1400 ot, 7 min)
3. odstranit supernatant a pelety resuspendovat v 500 $\mu$ l fixačního pufru pro TEM
4. inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě
5. zcentrifugovat (1400, 7 min), pečlivě odstranit supernatant
6. přidat 10 - 15 $\mu$ l 1,5% agaru nebo želatiny (rozmíchat)
7. po ztuhnutí převrstvit 1,5ml fixačního pufru
8. dopravit do Českých Budějovic

V Českých Budějovicích vzorky zfixovali oxidem osmičelým a poté dehydratovali. Připravili z nich na přístroji Poly/Bed 812 ultratenké řezy a aplikovali je na kovovou síťku. Vzorky odeslali na pracoviště Přírodovědecké fakulty UK v Praze, kde jsme je sami vyhodnocovali pod elektronovým mikroskopem JEOL 1010.

## 2.2.4. Detekce exprese genů buněk A20 po infekci metodou RT-PCR

RT-PCR umožňuje detekci genů, které byly v daný okamžik aktivovány a které jsou přepsány do mRNA. Ta je izolována, pomocí reverzní transkriptázy, přepsána do cDNA a poté standardně amplifikována za použití vybraných primerů.

### PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE *F. TULARENSIS* LVS

Dvacet čtyři hodin před plánovaným provedením infekce jsme masivně naočkovali 3 plotny McLeod kmenem LVS ze štoky a ponechali je v termostatu při 37°C uložené víčkem dolů, aby nedošlo ke kontaminaci.

V den pokusu jsme připravili přibližně 4 ml bakteriální suspenze v PBS o optické denzitě (O.D.) přibližně jedna ( $= 5 \times 10^9$  bakterií/ 1ml PBS). Přístrojem WPA značky Bioware jsme naměřili přesnou O.D o hodnotě 1,13. Bakteriální suspenzi jsme rozplnili po 1 ml do čtyřech plastových zkumavek s víčkem (Eppendorf). Zkumavky jsme zcentrifugovali při 4800ot. po dobu 7 minut a supernatant opatrně odsáli nebo slili do roztoku s dezinfekcí. K získaným peletám jsem přidal 200  $\mu$ l kultivačního média Dullbeco ( $2,5 \times 10^9$  bakterií/100 $\mu$ l) a důkladně promíchali na třepače MS2.

### KONCENTRACE BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE

Z bakteriální suspenze v PBS jsme odebrali 50 $\mu$ l a zředili desítkovou řadou na koncentraci  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  a v duplicitě vyseli na plotny McLeod. Na každou jsme nakapali 50 $\mu$ l a rozetřeli hokejkou až do vsáknutí. Za 72 hodin po kultivaci při 37°C jsme spočítali CFU na každé plotně a vypočítali koncentraci CFU/1ml (podle vzorce 1 v kapitole 2.2.3.)

Skutečná vypočtená koncentrace je:  $1,62 \times 10^{11}$  CFU/ ml.

### PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ SUSPENZE

Nakultivovali jsme podle kapitoly 2.2.1. celkový počet  $5 \times 10^7$  buněk A20, potřebných do experimentu. Buňky jsme v kultivační lahvičce důkladně promíchali, suspenzi jsme odebrali do zkumavky a zcentrifugovali (1200ot, 5minut). Supernatant jsme odstranili a pelety resuspendovali v kultivačním médiu (Dullbeco +10% sérum, bez gentamycinu) na výslednou požadovanou koncentraci  $5 \times 10^6$  buněk/ml.

## INFEKCE

Infekci jsme prováděli ve 24 jamkových panelech. Do každé jamky jsme napipetovali po 1 ml buněčné suspenze A20 ( $\approx 5 \times 10^6$  buněk/ 1ml média) a podle výpočtu přidali 100 $\mu$ l bakterií v médiu abychom dodrželi příslušnou MOI = 500.

**Výpočet:** O.D. = 1,13  
Celkem buněk  $5 \times 10^7$   
1 jamka  $5 \times 10^6$  ..... potřeba  $2,5 \times 10^9$  bakterií / 1 jamku  
MOI = 500 (500 bakterií na 1 buňku)  
 $2,5 \cdot 10^9 / 5 \cdot 10^9 = X / 200$   
**X = 100 $\mu$ l média s bakteriemi**

Kromě bakterií jsme do jamek napipetovali ještě purifikované LPS z *E.coli* a LPS z *F. tularensis*.

### Postup:

1. do 8 jamek napipetovat po 1ml buněčné suspenze A20 ( $5 \times 10^6$  buněk/ml)
2. do 2 jamek přidat 100 $\mu$ l bakterií (MOI 500)
3. do 2 jamek přidat 20 $\mu$ l LPS (*E.coli*)- zásobní roztok 1mg/1ml PBS
4. do 2 jamek přidat 20 $\mu$ l LPS (*F.tularensis*) – zásobní roztok 1mg/1ml PBS
5. 2 jamky neinfikovat – kontroly
6. inkubovat 6 a 24 hod při 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
7. po intervalu buňky promíchat a zcentrifugovat (1400ot, 7 min)
8. opatrně odsát supernatant, možnost zamrazit na -20°C

## IZOLACE RNA

K peletám ve zkumavkách jsme ve sterilním boxu přidali 1ml trizolu (Gibco). Inkubovali ve stojánku po dobu 5 minut za laboratorní teploty. Do každé zkumavky jsme přidali po 0,2 ml chloroformu (Lachema) a důkladně protřepávali v ruce nejméně asi 15 vteřin, poté zkumavky nechali 2–3 minuty inkubovat při laboratorní teplotě. Po proběhlé inkubaci jsme na centrifuze Biofuge při 12.000ot/ 15 min oddělili 3 fáze. Spodní červená fáze obsahovala izolovanou DNA a proteiny, bílá mezifáze DNA a vrchní bezbarvá vodná fáze obsahovala RNA. Opatrně

jsme odebrali do čisté zkumavky pouze vrchní fázi s RNA (cca 500 $\mu$ l) tak, aby nedošlo k promíchání s mezifází.

RNA jsme precipitovali přidáním 0,5 ml isopropylalkoholu p.a. (Penta) a inkubovali 10 minut za laboratorní teploty. Po následné centrifugaci při 12000ot/10 min jsme odstranili supernatant a přidáním 1ml 75% ethanolu v diethylen karboxylu (DEPC) jsme RNA přečistili. Opětovně jsme zkumavky zcentrifugovali při 7.500ot/5 minut, odsáli supernatant a pelety nechali důkladně vysušit ve sterilním boxu. K suchým peletám RNA jsme přidali 30 $\mu$ l DEPC vody a nechali po dobu 10 minut inkubovat při teplotě 56°C v bloku.

### MĚŘENÍ RNA NA SPEKOLU

Izolovanou RNA jsme kvantifikovali proměřením naředěného vzorku při vlnové délce 260 a její čistotu jsme zjistili z poměru hodnot naměřených při 260 a 280 nm na spektrofotometru Helios. Poměr 260/280 by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 až 2,0.

Na měření RNA jsme museli zásobní roztok 50krát naředit. Odebrali jsme tedy 10 $\mu$ l roztoku RNA a doplnili 490 $\mu$ l DEPC vodou na výsledných 500 $\mu$ l. Ze zkumavky jsme roztok kvantitativně převedli do měřicí kyvety a změřili absorbanci. Jako slepý vzorek jsme vzali čistou DEPC vodu. Ze změřených hodnot jsme vypočítali (podle vzorce 2) koncentraci RNA v  $\mu$ g/ml u jednotlivých vzorků. Pro syntézu cDNA je optimální vzít 2 $\mu$ g RNA a doplnit na celkový objem 5 $\mu$ l přidáním DEPC.

Vzorec 2:  $O.D._{260} \times \text{ředění (50)} \times \text{faktor (40)} = \dots\dots\dots \mu\text{g RNA/ ml}$

**Tab. 1:** Vypočítané množství RNA do syntézy cDNA u vzorků v 6-ti hodinovém intervalu

	absorbance 260 nm	koncentrace $\mu$ g/ml	$\mu$ l RNA + $\mu$ l DEPC vody
kontrolní buňky	1,0773	2154,6	1,1 + 3,9
LVS	0,9388	1877,6	1,1 + 3,9
LVS LPS	0,4529	905,8	2,2 + 2,8
LPS <i>E.coli</i>	0,4717	943,4	2,2 + 2,8

**Tab. 2:** Množství RNA do syntézy cDNA u vzorků v 24-ti hodinovém intervalu.

	absorbance 260 nm	koncentrace μg/ml	μl RNA + μl DEPC vody
kontrolní buňky	0,7950	1590,0	1,25 + 3,75
LVS	0,9230	1846,0	1,1 + 3,9
LVS LPS	0,5979	1195,8	1,7 + 3,3
LPS <i>E.coli</i>	0,5609	1121,8	1,7 + 3,3

### SYNTÉZA cDNA

Vypočítaná množství RNA a DEPC vody o celkovém objemu 5μl (tab.1,2) jsme napipetovali do označených zkumavek pro PCR (200 μl) a přidali 0,5μl Random primeru a 2,5μl DEPC (celkem 3μl). Zkumavky jsem vložili do termocyklu (GeneAmp 9700) a nastavili 5 minutovou inkubaci při 95°C. Po inkubaci jsme je ve stojánku položili na led a do každé z nich jsme přidali po 22μl RT mixu. Součástí RT mixu je směs nukleotidů dNTP, kterou jsme připravili podle pokynů v kapitole 2.1.2. ze zásobních roztoků. Zkumavky s celkovým objemem 30μl jsme přenesli do termocyklu a zapnuli program pro přepis do cDNA.

Přepis do cDNA: 37°C.....60min  
42°C.....30min  
70°C.....5min

**RT – mix:** 5,1μl DEPC voda  
6,0μl RT buffer, 5x koncentrovaný  
3,0μl DDT 0,1M  
1,0μl RNAsin ( 40 U )  
3,0μl ac. BSA, 10x ředěný ( 1mg/ml )  
2,4μl dNTP ( 10mM/base )  
1,5μl superscript ( 400 U )  
celkem 22μl



## cDNA AMPLIFIKACE

Do každého vzorku určeného k amplifikaci specifického úseku cDNA se připravuje celkem 5 $\mu$ l cDNA + DEPC vody a 20,0 $\mu$ l PCR mixu. Při každé amplifikaci jsme připravovali negativní a pozitivní kontrolu. Negativní kontrola obsahovala PCR mix a 5 $\mu$ l DEPC. Pokud nebyla pozitivní kontrola dodána komerčně, připravovali jsme ji z pozitivního vzorku tisícinásobným zředěním.

<b>PCR – mix:</b>	13,0 $\mu$ l DEPC voda	
	2,5 $\mu$ l Buffer IV, 10x koncentrovaný	
	1,5 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> , 25mM	
	1,0 $\mu$ l ac. BSA, 10 mg/ml, 10x ředěný	
	0,5 $\mu$ l dNTP, 100mM	
	0,5 $\mu$ l primer S –sense	10 pmol/ $\mu$ l
	0,5 $\mu$ l primer AS-antisense	10 pmol/ $\mu$ l
	0,5 $\mu$ l Taq polymerasa 5 U/ $\mu$ l	
	<b>celkem 20<math>\mu</math>l</b>	

**Standardizace množství cDNA** se provádí pomocí house-keeping genu. Při prvním pokusu jsme do amplifikace pipetovali 1 $\mu$ l cDNA a do PCR mixu přidávali primery pro myši  $\beta$ -aktin. Tento gen je aktivován stále, takže dochází vždy k přepisu do mRNA. Podle výsledků následné elektroforézy jsme do amplifikace pro jednotlivé cytokiny pipetovali stejné popř. upravené množství cDNA, které jsme stanovili podle intenzity proužků pro  $\beta$ -actin. U jednotlivých primerů jsme dodržovali doporučené nebo hledali optimálnější teploty, při kterých se navazují na oddělené řetězce DNA. Počty cyklů jsme nastavovali tak, aby výsledky elektroforézy byly co možná nejvíce zřetelné.

## ELEKTROFORÉZA

Před provedením elektroforézy jsme si připravili agarózový gel. V Erlenmayerově baňce jsme zahřátím rozpustili 1,5g agarózy ultra pure (Gibco) ve 100ml pufru 0,5xTBE. Chladnější roztok jsme nalili do formy na gel, odstranili případně vzniklé vzduchové bubliny a nechali několik desítek minut ztuhnout. Připravené gely jsme uchovávali v uzavřené kádince s 0,5x pufrem TBE i několik týdnů.

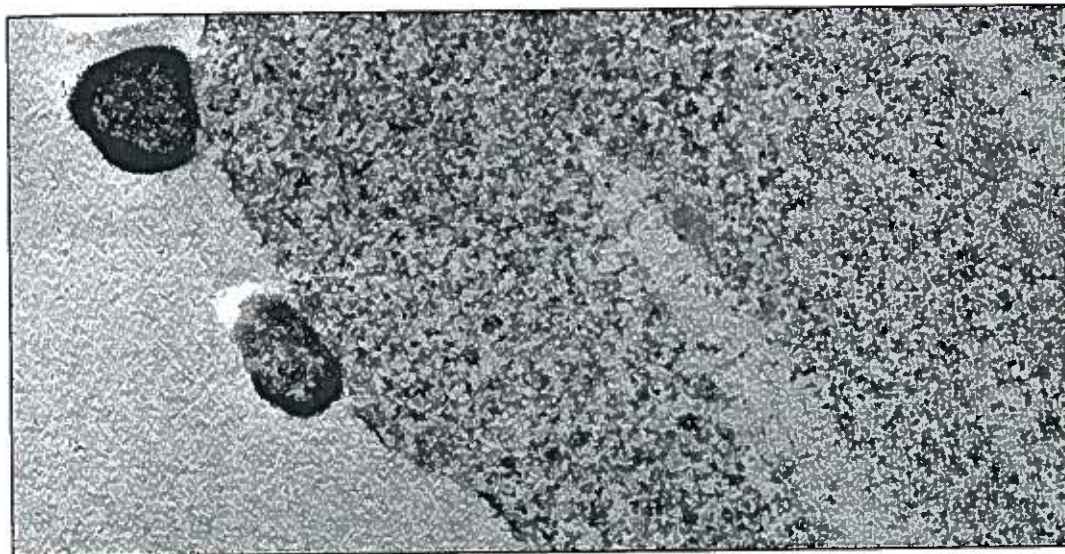
Připravili jsme si 750 ml roztoku ethidium bromidu o koncentraci 2 $\mu$ g/ml podle pokynů v kapitole 2.1.2, který jsme uchovávali v uzavřené kádince. Ethidium bromid je karcinogenní látka, proto jsme při manipulaci s ním používali rukavice.

Při samotné elektroforéze jsme položili gel do vaničky, tak aby směr proudu byl od minusu k plusu a gel byl zcela ponořen do pufru 0,5xTBE. Na kousek parafinového filmu jsme napipetovali 1,5 $\mu$ l loading buffer a 2 $\mu$ l DNA ladder. Směs jsme promíchali a opatrně přenesli automatickou pipetou celý objem do jamky v gelu. DNA ladder obsahuje 20 bandů (12 o velikosti 1.000 až 12.000 kb, 8 o velikosti 100 až 1650 kb). Vyšetřované vzorky amplifikované cDNA jsme zpracovávali podobným způsobem. Na parafinový film jsme napipetovali 1,5 $\mu$ l loading buffer a smíchali se 6 $\mu$ l DNA vzorku, směs promíchali a přenesli do jamky. Standardně jsme nanášeli nejprve DNA ladder, negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a vzorky ve zvoleném pořadí.

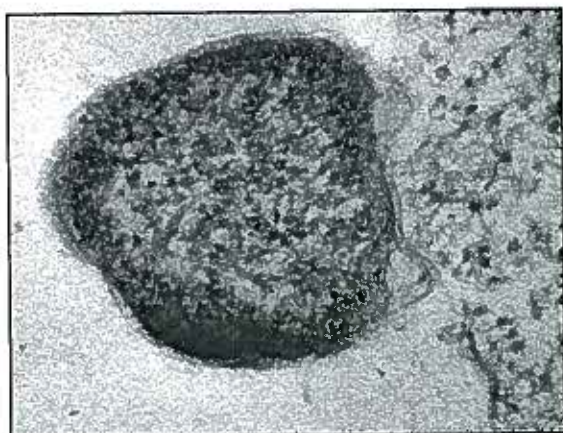
Pro elektroforézu jsme používali elektroforetickou vanu Mupid., kde jsme nastavili podmínky dělení na 100V po dobu 30 minut. Po provedené elektroforéze jsme gely 5 minut obarvovali v ethidium bromidu a přenesli do deionizované vody v kádince, kde došlo k odstranění nespecifického barvení gelu. Gely jsme detekovali pod UV lampou a zobrazovali programem BioCaptMN. Na další nutné úpravy a popisy obrázků jsme použili Powerpointu.

### 3. Výsledky

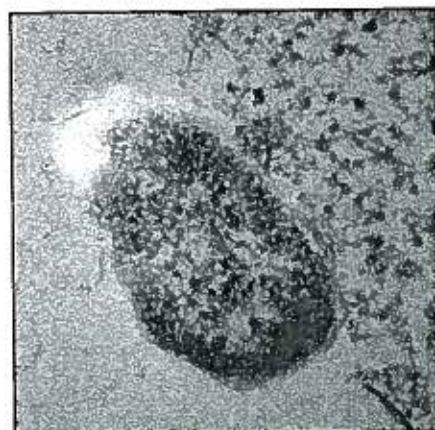
#### 3.1. Infekce buněk Ramos a A20 pro TEM



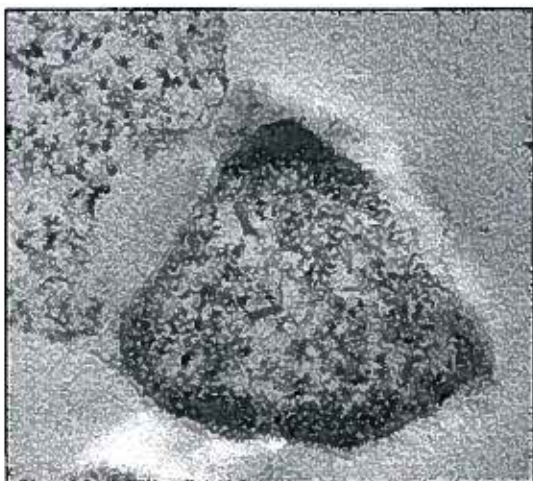
A



B

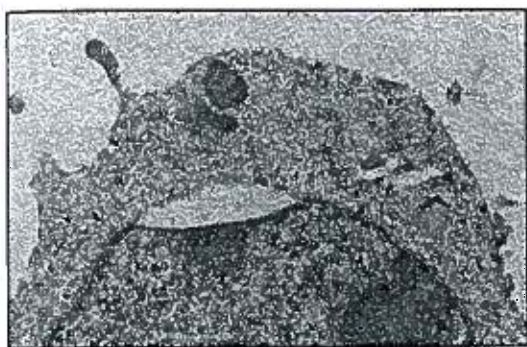


C

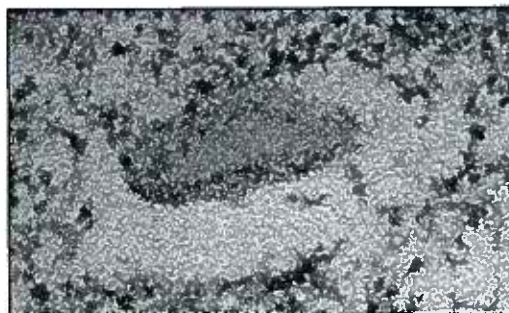


**D**

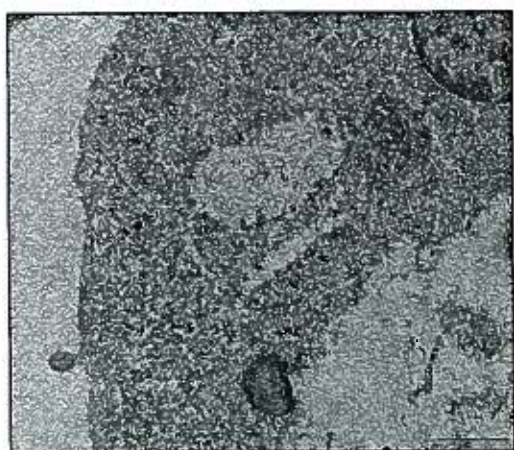
Obr. 1.: Infikované buňky z lidské B lymfocytární linie Ramos měly v 6 ti hodinovém intervalu na svém povrchu naadherovány bakterie *F. tularensis* LVS. Obrázek (A) jsme získali při zvětšení 25 000x a jsou na něm zřetelně viditelné dvě bakterie přichycené na buněčnou membránu. Fotografie (B, C a D) jsou detailním znázorněním této interakce při 100 000 násobném zvětšení. Na obrázku (D) jsme zachytili interakci bakterie s buňkou, kdy jsou jejich membrány spojeny pouze na dvou místech a mezi nimi je viditelný prostor.



A



B

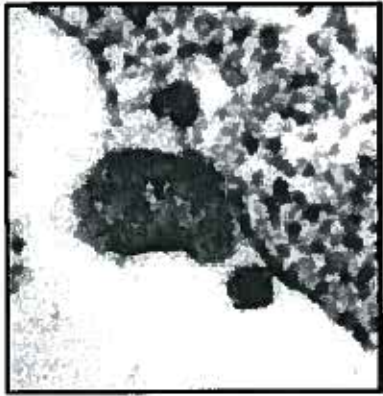


C

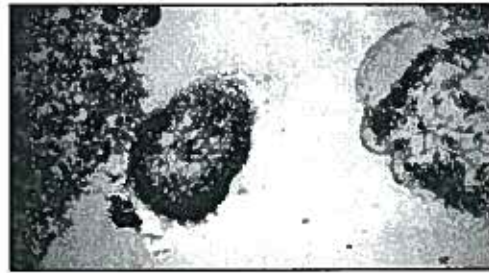


D

Obr. 2.: V buňkách Ramos, tentokrát po 12ti hodinách infekce, jsme objevili a zachytili převážně intracelulárně lokalizované bakterie *F. tularensis* LVS. Obrázky vlevo (A a C) byly pořízeny při 12 000 násobném zvětšení a jsou s pohledem na část B buňky společně s pohlcenou bakterií, zatímco fotografie vpravo (B a D) detailně zachycují intracelulárně umístěné bakterie při 100 000x zvětšení.



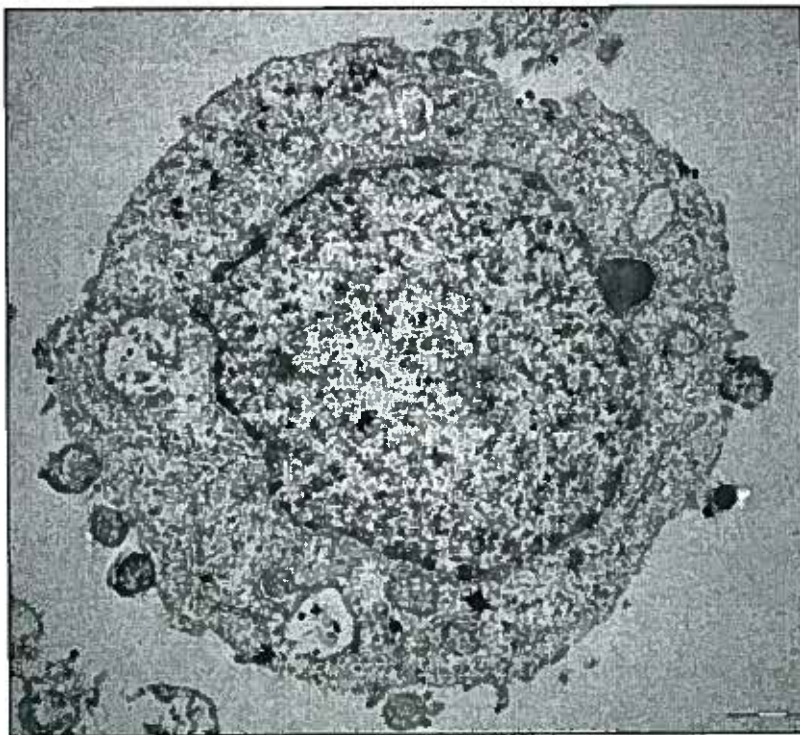
A



B



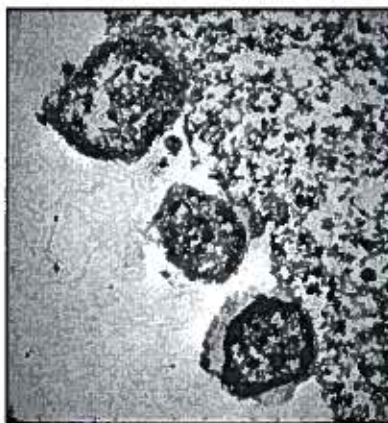
C



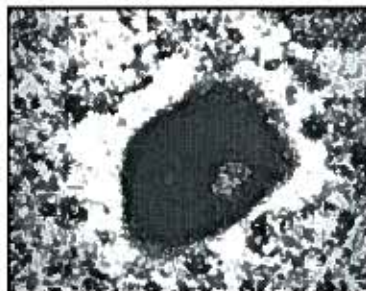
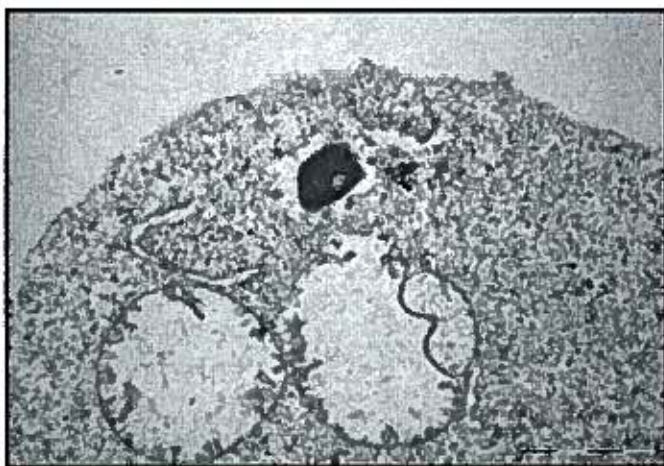
D



E



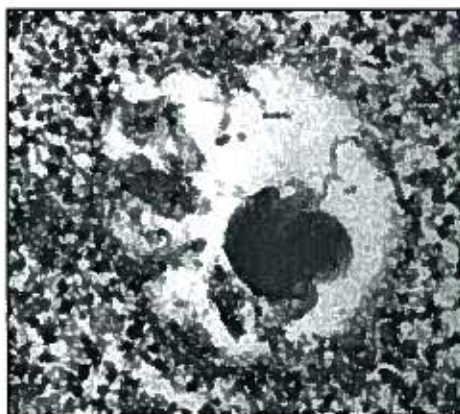
F



G



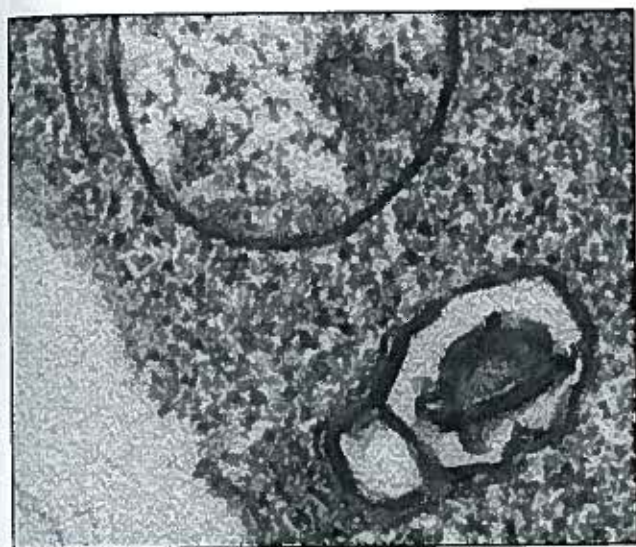
H



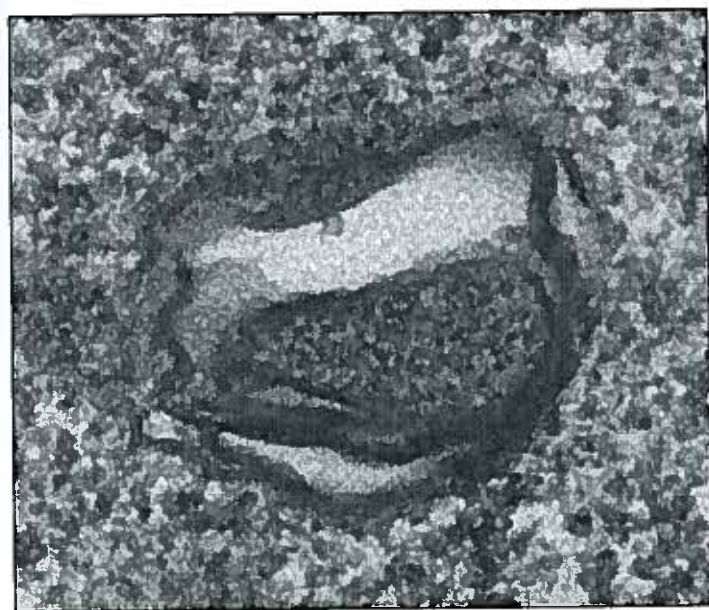
I

Obr. 3.: Fotografie zachycují myší B lymfocytární linii A20 v 6ti hodinovém intervalu po infekci. Obrázky (A,B a C) byly pořízeny při 80 000 násobném zvětšení a dokumentují naadherované bakterie na buněčném povrchu. Obrázky (D,E a F) jsme pořídili ve stejném časovém intervalu, kde obrázek (D) znázorňuje celou B buňku při zvětšení 12 000x a na (E a

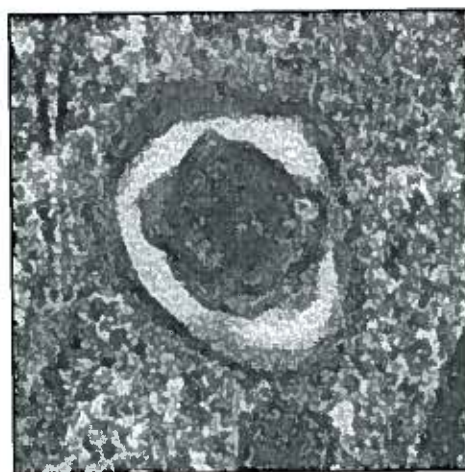
F) jsou 80 000x zvětšené a přiblížené bakterie naadherované na jejím povrchu. Obrázek (G) detailně zachycuje intracelulárně lokalizovanou bakterii při 80 000 násobném zvětšení (vpravo) a na větším snímku (vlevo) je celkový pohled na její umístění v B buňce při zvětšení 12 000x. Poslední fotografie (H a I) jsme pořídili při 80 000 násobném zvětšení. Jedná se o detailní záběry intracelulárně lokalizovaných bakterií *F. tularensis* LVS.



A



B

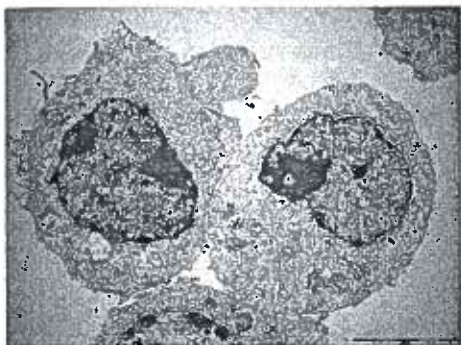


C

Obr. 4.: Fotografie jsou pořízené po 12ti hodinové inkubaci buněk A20 s bakteriemi LVS. Obrázky (A, B a C) zachycují při 100 000 násobném zvětšení intracelulárně umístěné bakterie v buňce.



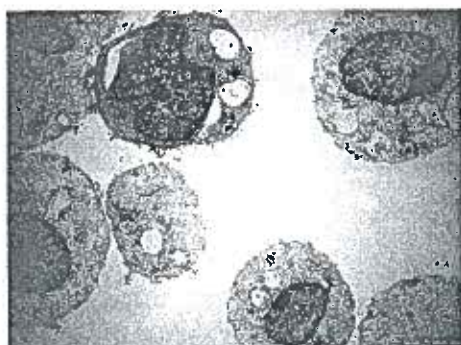
**kontrolní buňky A20, 6h**



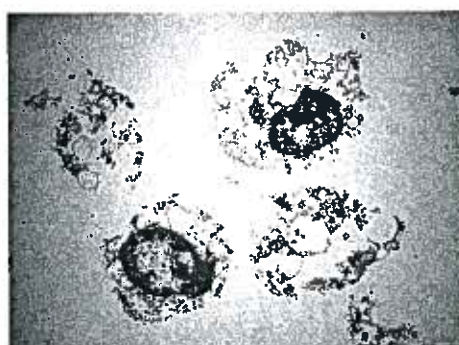
**kontrolní buňky A20, 24h**



**infikované buňky A20, 6h**



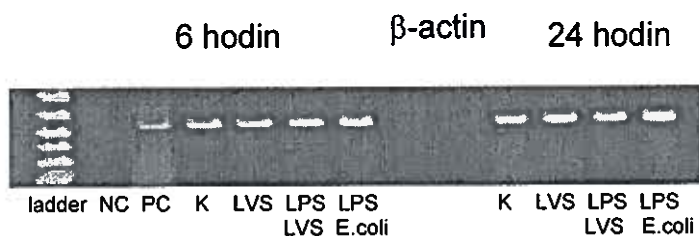
**infikované buňky A20, 24h**



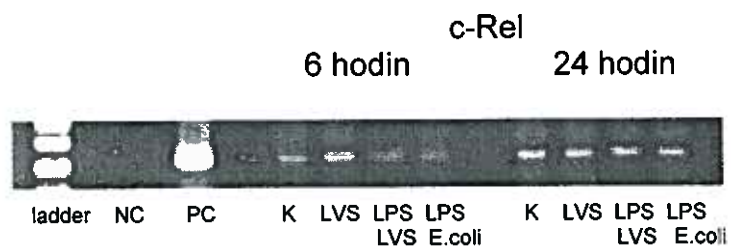
Obr.5.: Na fotografiích z elektronového mikroskopu jsou zachyceny infikované a kontrolní buňky A20 v 6 a 24 hodinovém intervalu. U infikovaných buněk po 6 hodinách pozorujeme změny v morfologii a zvětšené mitochondrie v porovnání s kontrolními buňkami. Výraznější rozdíly jsou patrné po 24 hodinách, kdy jsme našli ještě celistvé kontrolní buňky, zatímco infikované buňky byly ve stádiu apoptózy.

### 3.2. Metoda RT-PCR

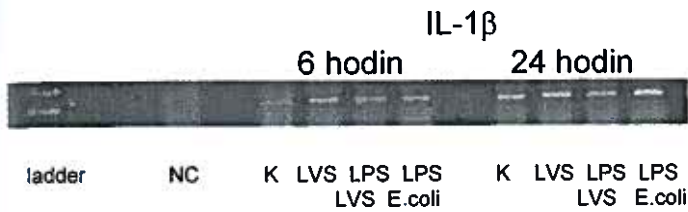
U bakteriemi *F. tularensis* LVS infikovaných buněk A20 z B buněčné linie jsme detekovali za použití různých primerů expresi genů pro cytokiny a další typy molekul. Výsledkem jsou snímky agarózových gelů s proužky o různých intenzitách, které odpovídají množství exprimované mRNA pro vyšetřovaný gen. Označení na gelech: ladder – 1 kB žebřík DNA, NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola, LVS – *F. tularensis* LVS, LPS LVS – LPS izolovaný z *F. tularensis*, LPS *E. coli* – LPS izolovaný z *E. coli*.



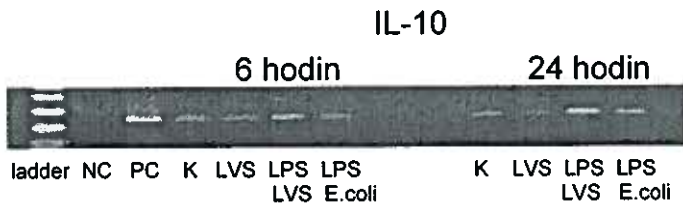
Obr. 6. : Analyzovaný house-keeping gen pro  $\beta$ -aktin použitý pro standardizaci metody. Amplifikace cDNA probíhala při teplotě 60°C v délce 28 opakujících se cyklů.



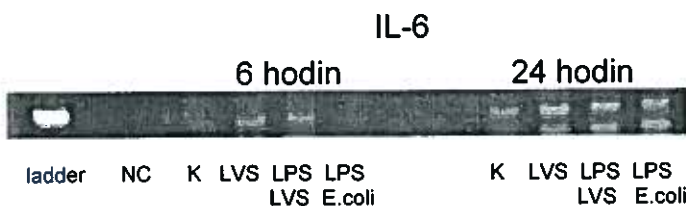
Obr.7.: Pro detekci c-Rel jsou nutné optimální podmínky, kdy teplota byla 60°C a amplifikace probíhala po 28 cyklů. Z gelu je patrné, že v 6ti hodinovém intervalu po infekci vyvolala nejvyšší expresi samotná *F. tularensis* LVS, u infekce oběma typy LPS byla exprese stejná, ale nižší než u LVS. Intenzita proužků ve druhém intervalu je o mnoho výraznější a u všech vzorků stejná včetně kontroly.



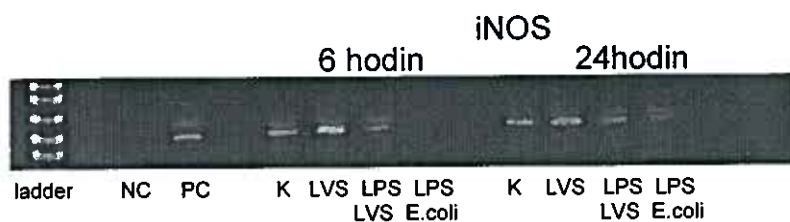
Obr.8.: Expresi sekretovaného interleukinu-1 $\beta$  jsme detekovali při teplotě 60°C a použili 32 cyklů amplifikace. Z výsledků je patrné, že po 6 hodinách infekce *F. tularensis* LVS zvýšila expresi IL-1 $\beta$ , zatímco jak tularemický LPS tak LPS *E.coli* zvýšenou expresi nevyvolali, v porovnání s kontrolními buňkami. Po 24hod je exprese mRNA u všech vzorků srovnatelná.



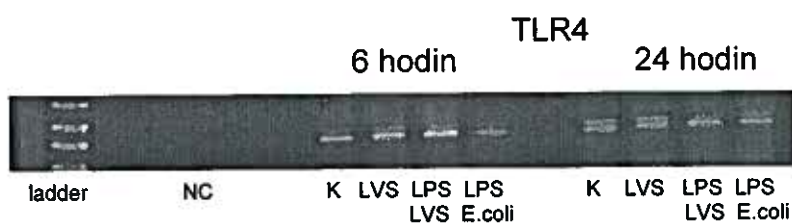
Obr.9. : Expresi genu pro interleukin-10 jsme analyzovali při 60°C a použili jsme 28 cyklů. B buňka při interakci s *F. tularensis* LVS neexprimuje gen pro IL-10 ani v jednom z intervalů. Zvýšenou expresi genu vykazují buňky stimulované tularemickým LPS a to jak po 6, tak i po 24 hodinách stimulace. U LPS *E. coli* je v prvním intervalu exprese nízká a podobná vzorkům kontroly i infekce LVS, ale po 24 hodinách vzrůstá.



Obr.10.: Vzorky cDNA s primery pro IL-6 byly amplifikovány při 55°C a 35 cykly. Přesto, že byla amplifikace opakována za použití jiné teploty navazování primerů, docházelo k detekci dvou proužků. V 6ti hodinovém intervalu došlo ke zvýšené expresi genu u buněk ovlivněných jak samotnou *F. tularensis* LVS, tak i jejím LPS. Po 24 hodinách byla exprese genu u všech vzorků zvýšená oproti časnému intervalu a intenzita proužků byla srovnatelná.



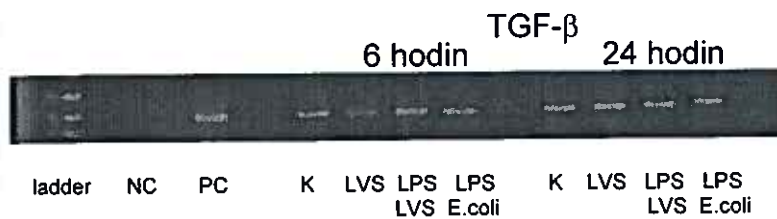
Obr.11.: Expresi genu pro iNOS (inducibilní NO-syntázu) jsme analyzovali při teplotě 60°C a 32ti cyklech. Nejvíce expresi genu v B buňkách stimulovala infekce LVS. Vysokou expresi vykazuje již po 6ti hodinách infekce, v následném časovém intervalu se tloušťka proužku nemění. Expresie genu stimulovaná oběma lipopolisacharidy není významná ani v jednom intervalu.



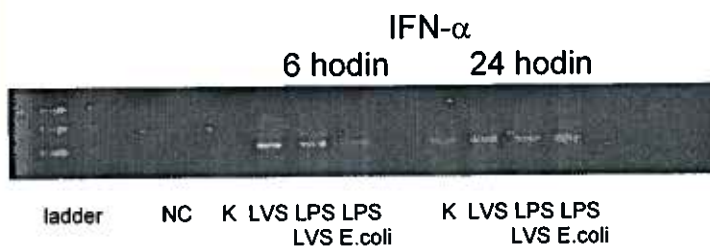
Obr.12.: Amplifikace cDNA pro detekci exprese TLR4 genu proběhla po optimalizaci při 60°C a 32 cyklech. Nejvyšší stimulační účinek na expresi genu pro TLR4 měl v 6ti hodinovém intervalu tularemický LPS a také samotná bakterie *F. tularensis* LVS expresi zvyšovala. Po 24 hodinách se exprese TLR4 po stimulaci *F. tularensis* a tularemického LPS snížila a byla srovnatelná s kontrolami a LPS z *E. coli*.



Obr.13. : Pro detekci cytokinu TNF- $\alpha$  byla optimální teplota 60°C a 32 cyklů amplifikace. Po 6ti hodinách inkubace došlo ke zvýšené expresi genu u všech tří stimulátorů, nejvíce u LPS z *E. coli*. Za 24 hodin byla situace opačná, exprese TNF- $\alpha$  byla u všech tří stimulátorů oproti kontrolám nižší.



Obr.14.: Pro analýzu transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) jsou optimální podmínky amplifikace 60°C a 28 cyklů. Z gelu je patrné, že v časném intervalu bakterie *F. tularensis* blokuje expresi tohoto růstového faktoru. Po 24 hodinách je pak úroveň exprese všech sledovaných vzorků stejná.



Obr.15.: Pro detekci exprese genu kódujícího interferon alfa byla použita amplifikace při 60°C a 33 cyklech. Oba LPS výrazně snižovaly expresi tohoto genu po 6 hodinách inkubace. Po 24 hodinách došlo oproti kontrole ke stimulaci a to jak v případě lipopolysacharidů, tak i samotné bakterie.

Amplifikaci cDNA s primery pro IL-12, IL-17 a IFN- $\gamma$  jsme provedli za použití podmínek reakce uvedených v tabulkách 3 a 4. Bohužel se nám nepodařilo detekovat expresi genů u těchto cytokinů.

**Tab. 3:** Souhrn exprimovaných genů a podmínky při amplifikaci jejich cDNA

	<b>Beta aktin</b>	c-Rell	IL-1 beta	IL-10	IL-6	iNOS	TLR4
Teplota	<b>60</b>	60	60	60	55	60	60
Počet cyklů	<b>28</b>	28	32	28	35	32	32

**Tab. 4:** Souhrn exprimovaných genů a podmínky při amplifikaci jejich cDNA

	IFN alfa	IL-17	TNF alfa	TGF beta	INF gama	IL-12
Teplota	60	55	60	60	55	60
Počet cyklů	33	30	32	28	32	32

### 3. Diskuse

V diplomové práci jsme se zabývali tématem interakce lidských a myších B buněčných linií s intracelulární bakterií *Francisella tularensis* LVS.

Až do konce 90. let se úloze B buněk a specifických protilátek v kontrole průběhu imunitní odpovědi k *Franciselle tularensis* nepřikládala taková váha. Všeobecně byl akceptován názor, že onemocnění vyvolané intracelulárním patogenem je kontrolováno T buňkami. Pokusy Karen Elkins na athymických *nu/nu* myších a scid myších dokázaly protekci myši proti sekundární letální dávce LVS, která nezávislá na T buňkách, ale prokázala se její závislost na B buňkách, i když ne na jimi tvořených protilátkách (18,19). Karen Elkins věří, že tato funkce zahrnuje nespecifickou aktivaci B buněk, která se podílí na přirozené imunitě a současně/nebo tvoří přechod mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Mechanismus zapojení B buněk do přirozené imunity nebyl však doposud studován.

Jednou ze základních otázek při řešení problému zapojení B buněk v časné imunitní odpovědi k *F. tularensis*, bylo, jestli vůbec dochází k přímému kontaktu mezi B buňkami a *F. tularensis*. Pro objasnění této otázky jsme využili transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). Bakteriemi *F. tularensis* LVS jsme infikovali obě buněčné linie, myši A20 a lidskou Ramos po dobu 6, 12 a 24 hodin. Při analýze zhotovených obrázků jsme byli překvapeni, že nejenže jsme pozorovali bakterie, které jsou adherovány na povrchu buněk (obr. 1, 3-A,B,C,E a F), ale také bakterie uvnitř buněk a to nezávisle na zvolené buněčné linii a ve všech sledovaných časových intervalech (obr. 2,3-G,H,I a 4). V podstatě je to nový fenomén, protože se nám v literatuře podařilo najít pouze jedinou práci, která dokladovala přímý kontakt bakterie a B buněk. Jednalo se o práci A. Menona a kol. (21), který infikoval buněčnou linii Ramos RA-1 a izolované myši B buňky intracelulárním patogenem *Listerií monocytogenes*. Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie detekoval bakterie *L. monocytogenes* adherované na povrchu B buněk a také bakterie pronikající dovnitř buňky. A. Menon dále zjistil, že v průběhu inkubace B buněk s *L. monocytogenes* dochází ke zvyšování apoptózy a nekrózy. To odpovídá i naší analýze snímků z elektronové mikroskopie, kdy jsme detekovali po 6ti hodinách buňky se zvětšenými, aktivovanými mitochondriemi a po 24 hodinách buňky, které vykazovaly strukturální změny odpovídající apoptóze oproti kontrolním buňkám, které byly beze změn (obr.5).

V další části mé diplomové práce jsme studovali změny v expresi genů kódujících proteiny, které jsou jednak zapojeny v signálních cestách (TLR4 a c-Rel) nebo se podílí na antimikrobiální funkci buněk (iNOS) a nebo jsou součástí mezibuněčné komunikace (např.

cytokiny). V této oblasti můžeme diskutovat pouze srovnání s obecně známými funkcemi jednotlivých proteinů, protože nebyly dosud studovány na podobném modelu jako jsem použili my.

Toll like receptory (TLR) zahrnují členitou skupinu membránových molekul schopných rozpoznat bakteriální konzervativní antigenní struktury (PAMP – pathogen-associated molecular patterns). TLR4 byl první charakterizovaný savčí Toll. Je exprimován na různých typech buněk, hlavně však na buňkách imunitního systému jako jsou makrofágy, dendritické buňky nebo B buňky. TLR4 funguje jako signální receptor pro bakteriální lipopolysacharidy. Pro rozpoznání bakteriálního LPS potřebuje TLR4 několik molekul. Jednak je to sérový protein LBP (LPS-binding protein), který se na LPS váže před vazbou na komplex TLR4/CD14 a pak molekula MD-2. U B buněk byla popsána další molekula zapojená v rozpoznávání LPS–RP105 (CD180), která je v rozpoznávání asociována s proteinem MD-1. Při vazbě na komplex CD14/TLR4/MD-2 může docházet k aktivaci signální cesty (1) přes MyD88, JNK/p38 a NFκB a tím aktivaci genů např. pro TNF-α nebo aktivaci signální cesty (2) přes molekuly TRIF, TBK1 (TANK binding kinase), IRF3 a tím aktivaci genů kódujících IFN-β, RANTES a IP-10.

Infekce monocyto-makrofágové linie J774 bakterií *F. tularensis* způsobuje inhibici TLR-zprostředkovanou aktivaci signálních cest vedoucích k produkci cytokinů TNF-α a IL-1. Opačné účinky vyvolá pouhá stimulace buněk J774 čištěným LPS *E.coli*, kdy se zvyšuje aktivace genů a produkce cytokinů TNF-α a IL-1 (14). Zdá se, že zcela jinak reagují na infekci *F. tularensis* B buňky. Po 6ti hodinách kultivace buněčné linie A20 s *F. tularensis* LVS dochází ke zvýšené expresi TLR4 a také genu pro TNF-α (obr. 12,13). Aktivace TLR4 po stimulaci tularemickým lipopolysacharidem byla dokonce ještě vyšší než po infekci. Poměrně překvapující je nižší exprese TLR4 po stimulaci LPS z *E. coli*. Na základě těchto výsledků bude velmi zajímavé provést následné experimenty, které budou sledovat expresi genů pro proteiny Myd88, cJun, IRF-3, IP-10 a IFN-β. Pokud bude potvrzena aktivace obou signálních cest, je cesta vedoucí k aktivaci B buněk na *F. tularensis* zcela odlišná od makrofágů.

Kromě genu pro TLR4 jsme amplifikovali mRNA pro c-Rel, který se také jako TLR4 zapojuje do signálních drah v různých typech buněk. C-Rel je jedním ze členů Rel/NF-κB rodiny transkripčních faktorů, které jsou nezbytné pro mitogenem indukovanou B buněčnou proliferaci. Bylo také publikováno, že Rel/NF-κB rodina se podílí na inhibici buněčných apoptických signálů, vyvolaných různými vnějšími stimuly. Práce Owyanga dokumentuje, že



c-Rel je nutný pro inhibici receptorem zprostředkované apoptózy B buněk, ale nikoliv pro inhibici Fas-zprostředkované apoptózy (22). Na druhou stranu byly publikovány práce, kdy zvýšená exprese c-Rel měla za výsledek zvýšenou apoptózu u buněk kostní dřeně a u HeLa buněk (23). Příspěvek každého člena z Rel skupiny je pravděpodobně závislý na typu a stupni diferenciaci buňky a převážně na stimulu vedoucího k buněčné smrti.

Aktivace c-Rel je zprostředkována přes četné povrchové receptory B lymfocytů. Mezi ně patří molekuly imunoglobulinů typu IgM a CD40. Skupina Fas receptorů lokalizovaných na membráně nevede k aktivaci faktoru c-Rel, ale přímo indukuje apoptózu. Blokádu Fas signální cesty mohou způsobit IgM a snad i molekuly CD40 přes c-FLIP a FAIM, která je nezávislá na c-Relu. Aktivovaný c-Rel je odpovědný za regulaci genů *Bcl<sub>XL</sub>* a *A1/Bfl 1*, přičemž tyto geny a hlavně jejich produkty se podílí na inhibici apoptických signálů v mitochondriích (22). V dostupných literárních pramenech jsme nenašli žádné studie zabývající se přímo expresí c-Rel u B lymfocytů infikovaných bakteriemi. Pro detekci aktivace genu pro c-Rel jsme se rozhodli na základě výsledků elektronové mikroskopie (TEM), kdy jsme překvapivě objevili známky apoptózy u infikovaných buněk obou linií (Ramos a A20) po infekci bakteriemi *F. tularensis* (obr.5). Při RT-PCR detekci (obr.7) byla po 6ti hodinách patrná zvýšená aktivace genu pro c-Rel u B buněk infikovaných bakteriemi, zatímco u kontrolního a LPS stimulovaných vzorků byla intenzita proužků nízká. Bohužel vlivem metodické chyby, kdy byly buňky kultivovány v menším množství kultivačního média než bylo potřeba a médium bylo nutričně vyčerpáno, byly znehodnoceny výsledky exprese mRNA pro c-Rel v pozdním intervalu. Na fotografii gelu (obr.7) je vidět stejná intenzita všech proužků včetně proužku pro kontrolní vzorek. Z časových důvodů nebylo možné opakovat infekci, izolaci RNA a amplifikaci specifických úseků cDNA pro c-Rel, ale bohužel i pro další cytokiny IL-1 $\beta$  (obr.8) nebo TGF- $\beta$  (obr.14) u kterých můžeme po 24 hodinách sledovat stejný jev.

Za hlavní producenty IL-1 $\beta$  jsou považovány aktivované makrofágy, ale dalšími významnými zdroji mohou být i jiné typy buněk jako B lymfocyty nebo epiteliální buňky. Cytokin IL-1 $\beta$  je nejen důležitým prozánětlivým činitelem, ale současně i prokázaným aktivátorem tvorby reaktivních mediátorů kyslíku (ROI) v buňce. Tímto je odpovědný za antimikrobní funkce. Signální cesty vedoucí k expresi genů pro ROI po interakci IL-1 $\beta$  s povrchovým receptorem IL-1R jsou závislé na buněčném typu. Lymfocytární buňky exprimují po stimulaci receptorem fosfolipázu A2, enzym 5-lipoxigenázu (5-LOX) a aktivační protein FLAP, které jsou potřeba pro vylučování ROI. Tvorbu mediátorů kyslíku u monocytů

zprostředkovává jiný enzymatický komplex, kterým je NADPH oxidáza společně s proteiny Rho a Rac1. Mediátory kyslíku spouští v buňkách aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Není dosud zřejmé, které proteiny či molekuly se zúčastňují této fáze, ale předpokládá se, že ROI působí buňce oxidační stres, který pravděpodobně vede k degradaci hlavního inhibitoru I $\kappa$ B čímž se spustí aktivace NF- $\kappa$ B a přepis dalších genů. (24).

Gen iNOS kóduje inducibilní NO-syntázu, což je enzym podílející se na uvolňování oxidu dusnatého. N-oxid je zařazen do skupiny RNI (reaktivní mediátory dusíku) a působí bakteriocidně uvnitř makrofágů současně s reaktivními mediátory kyslíku.

Vzhledem k poznatkům z Bonizzioho studie (24), a protože jsme měli k dispozici primer pro iNOS, rozhodli jsme se provést detekci aktivovaného genu iNOS, a také detekci IL-1 $\beta$  v infikované B buněčné linii A20.

V průběhu infekce monocyto-makrofágové linie J774 bakterií *F. tularensis* LVS a purifikovanými LPS dochází ke zvýšené produkci N-oxidů a také zvýšené expresi genu pro iNOS-syntázu (25). V našem experimentu s B buňkami jsme mohli, již po 6ti hodinách inkubace, pozorovat zvýšenou expresi genu pro iNOS (obr.11). Jednalo se o buňky infikované bakterií *F. tularensis* LVS. Ke stejnému zjištění jsme dospěli při pohledu na gel s detekcí mRNA pro IL- $\beta$  (obr.8). Nejvyšší expresi, podobně jako u genu iNOS, vyvolala bakteriální infekce. V porovnání s kontrolními vzorky nedošlo k aktivaci genů pro iNOS ani IL-1 $\beta$  po stimulaci tularemickým LPS a lipopolysacharidem z *E.coli*. Jak jsme se již zmínili zabránila nám metodická chyba porovnat změny mezi 6 a 24 hodinami u exprese IL-1 $\beta$  a je také diskutabilní výsledek pro expresi iNOS po 24 hodinách.

Kromě IL-1 $\beta$  jsme studovali exprese i dalších cytokinů účastnících se na mezibuněčné komunikaci, i když B buňky nebyly v literatuře označovány za jejich hlavní producenty. Jedná se o IL-10 a IL-6 za jejichž zdroj jsou v prvé řadě považovány aktivované pomocné T lymfocyty (T<sub>H</sub>2). T<sub>H</sub>2 lymfocyty prostřednictvím sekrece uvedených cytokinů indukují klonální expanzi a diferenciaci B buněk s expresí kostimulačních receptorů (CD40L). T<sub>H</sub>2 cytokiny zároveň oslabují sekreci IL-1, IL-12 a TNF- $\alpha$  u aktivovaných makrofágů a snižují u antigen prezentujících buněk (APC) expresi povrchových MHC II třídy. Produkci specifického spektra cytokinů potlačují aktivaci T<sub>H</sub>1 buněk a makrofágů. Interleukiny 6 a 10 se tak uplatňují převážně v mezibuněčné komunikaci při extracelulárních infekcích (28). V literatuře jsou v souvislosti s cytokinem IL-10 uvedeny jeho benefiční účinky při některých autoimunitních chorobách. Napomáhá obnovení tolerance imunitního systému

k myelinovému obalu vláken v CNS u roztroušené mozkomíšní sklerózy a tlumí kolagenem indukovanou revmatoidní artritidu (26).

B lymfocyty odpovídají na přítomnost různých stimulačních molekul zvýšenou aktivací genů pro IL-6 a IL-10. Aktivace genu je zprostředkována přes TLR receptory a MyD88. K těmto závěrům dospěli při studii B buněk na Institutu Maxe Plancka v Mnichově pod vedením Simonem Fillatreau. Kromě aplikace LPS z *Escherichia coli*, stejně jako v našem experimentu, stimulovali B buňky ještě purifikovanými LPS z kmenů *Salmonella typhosa* a *Klebsiella pneumoniae* (26). B buňky tímto způsobem reagují nejen na přítomnost bakteriálních komponent, ale i při virové infekci (Dengue virem) zvyšují expresi genu pro IL-6 a současně podporují replikaci cizorodé nukleové kyseliny (27).

V souladu s publikacemi se v našich pokusech zvýšeně exprimoval gen pro IL-10 po stimulačním působení tularemického LPS a LPS *E.coli* (obr.9). Tularemický LPS stimuloval expresi velmi výrazně již po 6 hodinách a ta se později ještě zvýšila. Exprese u LPS z *E.coli* byla zpočátku stejná s kontrolním vzorkem, ale v dalším časovém intervalu jsme zaznamenali její vzestup. Překvapující pro nás byla infekce LVS, která neaktivovala přepis genu ani po 24 hodinové kultivaci. Intenzita jejích proužků byla pokaždé stejná s kontrolním neinfikovaným vzorkem. Analýza mRNA pro IL-6 nám připravila značné problémy. Přesto, že jsme opakovaně experimentovali s teplotou a použili i rozdílných počtů cyklů amplifikace, nepodařilo se nám získat kvalitní výsledek (obr.10). Stále se nám na gelech objevovali nespecifické reakce v podobně zdvojených proužků. Nepomohla nám v tom bohužel ani změna primerů. Poněvadž se jedná o významný cytokin, zahrnuli jsme jej do výsledků.

Interferony jsou jednou z nejdůležitějších skupin cytokinů a podílejí se na regulaci mnoha dějů. Vyskytují se tři hlavní podtypy IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Interferon gama je silným agonistou makrofágů. Podporuje jejich úlohu v přirozené imunitě aktivací cidního působení na pohlcené mikroorganismy a prezentací peptidových fragmentů v komplexu s MHC II třídy. IFN- $\gamma$  stimuluje i cytotoxické NK buňky a společně s IFN- $\alpha$  se tak uplatňuje v obraně proti virovým infekcím (28). Zvýšená aktivace genu pro IFN- $\alpha$  je zprostředkována interakcí bakteriálních LPS s povrchovými TLR4 receptory. Tím je aktivována signální cesta přes molekuly TRIF, TRAM a TBK1 vedoucí k fosforylaci molekul IRF-3, které iniciují přepis genu pro IFN- $\beta$ . Tímto způsobem vzniklý cytokin IFN- $\beta$  po interakci s membránovým komplexem receptorů IFNAR1-IFNAR2 vyvolá transkripci genu IFN- $\alpha$ . Kromě LPS, stimulují vylučování IFN- $\alpha$  i jiné bakteriální komponenty. V interakci s nimi se uplatňují např. TLR7, 8 a 9 buněčné receptory a přes MyD88 je aktivována molekula IRF-3. Poté je

signální dráha společná s TLR4 receptory (29). Při amplifikaci cDNA s primery pro IFN- $\gamma$  jsme dodrželi doporučenou teplotu 55 stupňů. Přesto na ararózových gelech nebyly známky po amplifikované cDNA. Z časových důvodů jsme pokus neopakovali a soustředili se směrem k optimalizaci podmínek pro ostatní cytokiny.

Výsledky naší analýzy IFN- $\alpha$  (obr.15) odpovídají konstatování (29), že bakteriální komponenty aktivují expresi tohoto cytokinu. V časném intervalu jsme pozorovali, že *F. tularensis* stimulovala expresi genu více než její LPS. Bohužel jsme neobdrželi žádnou reakci od kontrolního vzorku, kde se přikláníme spíše k tomu, že došlo k chybě v průběhu PCR reakce než k tomu, že by exprese vůbec nebyla. Při vědomí vlivu metodické chyby po 24 hodinách lze říci, že i v tomto intervalu došlo ke zvýšené expresi genů pro IFN- $\alpha$  po stimulaci ať bakterií, tak oběma LPS.

Transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ) produkují T lymfocyty, makrofágy, krevní destičky, mastocyty a B lymfocyty. Cytokin působí imunosupresivně na různých úrovních. Podporuje toleranci k tělu vlastním i cizím antigenům. Inhibuje respirační vzplanutí makrofágů, a produkci různých cytokinů IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Blokuje funkce APC buněk a cytotoxické pochody u NK buněk. V budoucnu snad bude možné cytokin použít k terapeutických účelům. Testování probíhá u pacientů s autoimunitními chorobami jako je systémový lupus erythematosus. Dobré výsledky v tlumení alergických projevů již poskytly testy na myších modelech (30). V databázích jsme nenašli žádný článek zabývající se změnami exprese TGF- $\beta$  u infikované B buněčné linie ani publikace s tím související. Z výsledků je však zřejmé (obr.14), že po 6 hodinách dochází ke snížení jeho exprese u buněk infikovaných *F. tularensis*. Z obecně publikovaných údajů o makrofázích víme, že TGF- $\beta$  blokuje expresi IFN- $\gamma$  a především pro naše výsledky zajímavý údaj, že současně blokuje expresi TNF- $\alpha$ . Námi detekovaná snížená aktivace genu pro TGF- $\beta$  tak odpovídá zvýšené aktivaci genu pro TNF- $\alpha$ . Protože intenzita proužků po 24 hodinách je stejná, přikláníme se k názoru, jak jsme popsali v části o c-Rel, že došlo k výrazné expresi jak u kontrolních, tak u stimulovaných buněk v důsledku nedostatku nutrice.

Zdrojem IL-12 jsou makrofágy, NK buňky a B lymfocyty. Je známo, že podporuje rozvoj imunitní odpovědi směrem k aktivaci T<sub>H</sub>1 a NK buněk (28).

Interleukin 17 (IL-17) patří v současnosti k poměrně nově objeveným cytokinům. Pro lidské bronchiální epiteliální buňky (HBEC<sub>s</sub>) je silným stimulantem transkripce genů pro IL-8, Gro $\alpha$  a G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor). Tyto mediátory zvyšují počty leukocytů v respiračním traktu a tím působí silně prozánětlivě (31). Ve výsledkové části

(tab.4) jsme uvedli podmínky amplifikace cDNA pro IL-12 a IL-17. V pokusu jsme se řídili doporučenými podmínkami (teploty) pro jednotlivé primery. Spolu s IFN- $\gamma$  se nám u těchto třech cytokinů nepodařilo detekovat ani nepatrná množství genového produktu. Z časových důvodů jsme nepokračovali v optimalizaci podmínek pro pokus. Domníváme se, že jiné teplotní optimum nebude jediným důvodem našeho neúspěchu, v tomto ohledu by bylo nutné pokusy zopakovat.

## 5. Závěr

Naše experimenty navazovaly na pokusy Karen Elkins s B buňkami. Zjistila, že se neznámými mechanismy zapojují do časně imunitní odpovědi a tím přispívají k obraně *Francisella tularensis* LVS. Úloha B buněk byla vždy spojována především s pozdní imunitní odpovědí a to s vylučováním protilátek. Při studiu primární interakce se nám podařilo transmisní elektronovou mikroskopií prokázat a zdokumentovat přímou interakci B buňky s *Franciselou tularensis*. Bakterie jsou myší (A20) i lidskou (Ramos) buňkou pohlceny a lokalizovány intracelulárně. V závislosti na čase jsme nacházeli známky apoptózy, které se objevovaly již po 6 hodinách. Buňky na fotografiích s TEM byly po 24 hodinách rozpadlé. Přínosem by byla průtoková cytometrie, kdy bychom mohli sledovat zastoupení apoptických a nekrotických populací buněk a jejich změny v závislosti na čase.

Metodou RT-PCR jsme zjišťovali změny exprese různých genů po infekci LVS nebo stimulaci použitými LPS. Zajímavé výsledky nám poskytla analýza TNF- $\alpha$  a jeho TLR-4 zprostředkovaná aktivace. Zdá se, že u B buněk na rozdíl od makrofágů není působením *F. tularensis* inhibována signální cesta přes TLR4 receptory vedoucí k secernaci TNF- $\alpha$  a IL-1. Následující pokusy by se měli zaměřit na expresi genů pro molekuly zapojené v těchto signálních drahách a tím potvrdit nebo vyvrátit naše domněnky.

## 6. Použitá literatura

1. ABBAS, K. ABUL, LICHTMAN, H. A.: *Cellular and molecular immunology*. 5. vyd., Elsevier Science, 2003, s. 189–214, ISBN 0-7216-0008-5
2. YAZAWA, N., FUJIMOTO, M., SHINICHI, S., ASANO, N., et al: CD19 regulates innate immunity by toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood*, 2003, roč. 102, č. 4
3. FORESTIER, C., MORENO, E., MÉRESSE, S., PHALIPON, A., OLIVE, D. et al: Interaction of *Brucella abortus* lipopolysacchride with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infection and immunity*, 1999, roč. 67, č. 8, s. 4048 – 4054
4. ELLIS, J., OYSTON, P.F., GREEN, M. et al.: Tularemia. *Clinical mikrobiology reviews*, 2002, roč. 15, č. 4, s. 631–646
5. ELKINS, K., SIOBHÁN, C.C., BOSIO, C. M.: Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes and infection*, 2003, roč. 5, s. 135-142
6. LAURIANO, C.M., BARKER, J. R., YOON, SANG-SUN, NANO, F., et al: MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *PNAS*, 2004, roč. 101, č. 12, s. 4246–4249
7. CLEMENS, D.L., LEE BAI-YU, HORWITZ, M.: *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infection and immunity*, 2005, roč. 73, č. 9, s. 5892–5902
8. GOLOVLIOV, I., BARANOV, V., KROČOVÁ, Z., KOVÁŘOVÁ, H., SJÖSTEDT, A.: An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infection and immunity*, 2003, roč. 71, č. 10, s. 5940–5950
9. LINDGREN, H., GOLOVLIOV, I., BARANOV, V. et al: Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *Journal of medical microbiology*, 2004, roč. 53, s. 953–958
10. FORTIER, A., LEIBY, D.A., NARAYANAN, R.B., ASAFOADJEI, E., CRAWFORD, R., NACY, C. et al: Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infection and immunity*, 1995, roč. 63, č. 4, s. 1478–1483
11. HRSTKA, R., STULÍK, J., VOJTĚŠEK, B.: The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection – induces apoptosis in murine macrophages. [www.elsevier.com/locate/micinf](http://www.elsevier.com/locate/micinf)

12. LAI XIN-HE, GOLOVLIOV, I., SJÖSTEDT, A.: *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infection and immunity*, 2001, roč. 69, č. 7, s. 4691-4694
13. SANTIC, M., MOLMERET, M., KLOSE, K., JONES, S., KWAIK, Y.: The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cellular microbiology*, 2005, roč. 7, s. 969-979
14. TELEPNEV, M., GOLOVLIOV, I., GRUNDSTRÖM, T., TÄRNVIK, A., SJÖSTEDT, A.: *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 from murine macrophages. *Cellular microbiology*, 2003, roč. 5
15. MARIATHASAN, S., WEISS, D.S., DIXIT, V.M., MONACK, D.M.: Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/ caspase - 1 axis. *The journal of experimental medicine*, 2005, roč. 202, č. 8, s. 1043-1049
16. DREISBACH, V.C., SIOBHÁN, C., ELKINS, K.: Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infection and immunity*, 2000, roč. 68, č. 4, s. 1988-1996
17. ELKINS, K., LEIBY, A.D., WINEGAR, R.K. et al: Rapid generation of specific protective immunity to *Francisella tularensis*. *Infection and immunity*, 1992, roč.60,č. 11, s. 4571- 4577
18. ELKINS, K., BOSIO, M.C., JONES, T.R.: Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infection and immunity*, 1999, roč. 67,č.11,s. 6002-6007
19. CULKIN, S.J., JONES, T.R., ELKINS, K.: A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen *Francisella tularensis* strain LVS. *The journal of immunology*, 1997, roč.158, s. 3277-3284
20. STENMARK, STEPHAN, LINDGREN, H., TÄRNVIK, A. et al.: Specific antibodies contribute to the protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Science direct*, 2003, roč.35, č.2, s. 73-80
21. MENON, A., SHROYER, M.L., WAMPLER, J.L.: In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells. *Microbiology and infectious disease*, 2003, roč.26, s. 157-174
22. OWYANG, A., TUMANG, J.R., SCHRAM, B. et al.: C-rel is required for the protection of B cells from antigen receptor mediated but not fas mediated apoptosis. *The journal of immunology*, 2001, roč.167, s. 4948-4956



23. SU FEI, THEODOSIS, N., SCHNEIDER, R.J.: Role of NF- $\kappa$ B and Myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *Journal of virology*, 2001, roč. 75, č. 1, s. 215-225
24. BONIZZI, G., PIETTE, J., SCHOONBROT, S. et al.: Reactive oxygen intermediate dependent NF- $\kappa$ B activation by interleukin - 1 $\beta$  requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Molecular and cellular biology*, 1999, s. 1950-1960
25. WEINBERG, J.B., MISUKONIS, M.A., SHAMI, P.J. et al.: Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase: analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Aidsline med*, 1995, roč. 86, č. 3, s. 1184-95
26. FILLATREAU, SIMON, HOEHLIG, K., LAMPROPOULOU, V. et al.: B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, rok. 2002, roč. 3, s. 944-50
27. LIN WEN-YU, WANG, KUAN-JU, LEI HUAN-YAO et al.: Virus replication and cytokine production in Dengue virus infected human B lymphocytes. *Journal of virology*, 2002, s. 12242-12249
28. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.: *Základy imunologie*, 2. vydání, Triton, s. 89-99, ISBN 80-7254-215-X
29. THEOFILOPOULOS, A., BACCALA, R., BEUTLER, B. et al.: Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, roč. 23, s. 307-36
30. TIEMESSEN, M.M., KUNZMANN, STEFFEN, CARSTEN, B. et al.: Transforming growth factor- $\beta$  inhibits human antigen specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *International immunology*, 2003, roč. 15, č. 12, s. 1495-1504
31. JONES, C.E., CHAN, KATIE: Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth related oncogene -a a granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Cell mol. Biol.*, 2002, roč. 26, s. 748-753