

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kristýna Kopecká, DiS.

Vliv polyketidových antibiotik na signalizaci a funkční aktivitu lidské monocytární linie
The effect of polyketide antibiotics on signalling and functional activity of human monocytic
cell line

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha 2015

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

V Praze 14.8. 2015

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSs. za vedení diplomové práce a věnovaný čas. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Švachové za zaškolení pro práci v laboratoři a za cenné rady, Mgr. Evě Čečrdlové za uvedení do problematiky polyketidových antibiotik. Mé díky také patří Mgr. Liborovi Kolesarovi, Ph.D. za umožnění měření vzorků.

Abstrakt

Prozánětlivé cytokiny se významně podílí na rozvoji zánětlivé reakce. Pokud se z akutního zánětu stává zánět chronický, jedná je již často o patologický jev. Chronický zánět doprovází celou řadu závažných onemocnění s nejasnou prognózou, jako jsou například některé autoimunitní choroby. U těchto chorob není zpravidla příčina zcela objasněna a jejich léčba jen převážně symptomatická, kdy je navíc snaha utlumit imunitní systém. K tomuto účelu se používají různá imunosupresiva a zároveň zde nachází uplatnění i biologická léčba. Další možností je využít bioaktivní sekundární metabolity, které jsou produkovány různými mikroorganismy. Do této skupiny patří například makrolidová antibiotika a velký potenciál mají nově objevené polyketidy.

Cílem této práce bylo otestovat nově získané sekundární metabolity, které byly izolovány v laboratoři molekulární biologie aktinomycet na Akademii věd ČR. Testován byl manumycin A, manumycin B, colabomycin E, asukamycin A, asukamycin D, β -rubromycin, deoxynybomycin. Jako porovnávací látky byla použita makrolidová antibiotika clarithromycin a azithromycin dihydrate, která patří mezi komerčně vyráběná léčiva. Tyto látky byly testovány na monocytární linii THP-1. Buňky byly stimulovány pomocí $\text{IFN}\gamma$ a $\text{TNF}\alpha$ a zároveň byla přidána testovaná antibiotika. Po inkubaci byla měřena životnost buněk a povrchové znaky CD54 a HLA-DR pomocí průtokové cytometrie. Zároveň byla stanovena koncentrace IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α a RANTES v buněčném supernatantu. K určení koncentrace cytokinů byla využita metoda Luminex. Dále bylo hodnoceno jakým způsobem polyketidová antibiotika ovlivní proliferaci THP-1 buněk, zde byla použita elektronická biosenzorová technologie - xCELLigence systém. U vybraných testovaných látek se sledovala genová exprese pomocí kvantitativní reverzně transkripční PCR.

U buněk, které byly stimulovány $\text{IFN}\gamma$ jako jediný manumycin A při koncentraci 5 μM výrazně snížil expresi HLA-DR. V případě stimulace $\text{TNF}\alpha$ byl zaznamenán pokles povrchového znaku CD54 u manumycinu B, β -rubromycinu a to ve všech sledovaných koncentracích. Expresi HLA-DR u téhož stimulans byla snížena u asukamycinu D. Co se týče ovlivnění cytokinů v buněčném supernatantu, většina testovaných polyketidových antibiotik potlačila produkci IL-1 β a to jak při stimulaci $\text{IFN}\gamma$ tak $\text{TNF}\alpha$. Mimo jiné bylo zjištěno, že 5 μM manumycin A, aukamycin A a deoxynybomycin indukují u THP-1 buněk apoptózu. K ovlivnění buněčné proliferace došlo zejména u manumycinu B a deoxynybomycinu. Potlačení antiproliferačního účinku $\text{IFN}\gamma$ došlo u všech sledovaných antibiotik. U $\text{TNF}\alpha$ byl

tento účinek též potlačen všemi testovanými látkami s výjimkou asukamycinu D. Ovlivnění genové exprese různých cytokinů byla zatím sledováno pouze u manumycinu A, kdy buňky byly stimulovány pomocí TNF α . Bylo zjištěno snížení množství mRNA kódující IL-1 β a IL-6. Výsledky genové exprese potvrdily naměřené koncentrace cytokinů v buněčném supernatantu.

Výsledky potvrdily potenciální imunomodulační účinek sekundárních metabolitů streptomycet. Tyto látky budou dále preklinicky studovány s ohledem na možnost případného terapeutického využití.

Klíčová slova

prozánětlivé cytokiny, polyketidy, THP-1, povrchové znaky, buněčná proliferace, genová exprese

Abstract

Anti-inflammatory cytokines have an important role in the development of inflammatory reactions. If an acute inflammation turns into chronic it is very often a pathological phenomenon. Chronic inflammations accompany a whole number of serious diseases with an unclear prognosis, such as some of the autoimmune diseases. Usually, the cause of these diseases is not quite clear and the treatment is mainly symptomatic with an effort to suppress the immunity system. For this purpose we use various immunosuppressant drugs, and biological treatment is used, too. Another possibility is to use bioactive secondary metabolites produced by various microorganisms. In this group there are for example macrolides antibiotics, and a big potential is also seen in the recently discovered polyketides.

The objective of this work is to test the newly acquired secondary metabolites that were isolated in the Laboratory of Molecular Biology of Actinomycetes at the Czech Academy of Sciences. Tested were manumycin A, manumycin B, colabomycin E, asukamycin A, asukamycin D, β -rubromycin, deoxynybomycin. As comparative substances were used the macrolides antibiotics clarithromycin and azithromycin dehydrate, all of them commercial pharmaceuticals. These substances were tested on the monocytic line THP-1. Cells were stimulated using $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ and at the same time the tested antibiotics were added. After incubation the cell lifetime and surface characteristics CD54 and HLA-DR were measured using flow cytometry. Along with that the concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α and RANTES in the cell supernatant were determined. To determine the cytokine concentration the Luminex method was used. Furthermore, it was evaluated how the polyketide antibiotics affect the proliferation of THP-1 cells, using the electronic biosensor technology - xCELLigence system. Selected tested substances were monitored for gene expression using the quantitative reverse transcription PCR.

In cells stimulated using $\text{IFN}\gamma$ as the only manumycin A at a concentration of 5 μM the expression of HLA-DR decreased considerably. In the case of $\text{TNF}\alpha$ stimulation there was a decrease of the surface characteristic CD54 in manumycin B and β -rubromycin in all the concentrations monitored. The expression of HLA-DR with the same stimulant decreased in asukamycin D. As for the interference with cytokines in the cell supernatant, most of the polyketide antibiotics tested suppressed production of IL-1 β , both in $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ stimulation. Among others it was discovered that 5 μM manumycin A, aukamycin A and deoxynybomycin induce apoptosis of THP-1 cells. Cell proliferation was mainly affected in

manumycin B and deoxybomycin. Suppression of the IFN γ anti-proliferation effect was detected in all the antibiotics monitored. In the case of TNF α the effect was also suppressed by all the substances tested, except for asukamycin D. The effects on gene expression of various cytokines has so far been detected only in manumycin A, where the cells were stimulated using TNF α . A reduced number of the mRNA coding IL-1 β and IL-6 was recorded. The results of the gene expression confirmed the cytokine concentrations measured in the cell supernatant.

The results confirmed the potential immunomodulation effect of the secondary metabolites of streptomyces. These substances will further be studied pre-clinically in respect of the possible therapeutic usage.

Key words

anti-inflammatory cytokines, polyketides, THP-1, surface characteristics, cell proliferation, gene expression

Obsah

1	Úvod	13
2	Přehled literatury	14
2.1	Prozánětlivé cytokiny a jejich regulace.....	14
2.1.1	TNF α	14
2.1.2	IL-1 β	16
2.1.3	IL-6	17
2.1.4	IFN γ	17
2.2	Terapeutické potlačení prozánětlivých cytokinů	19
2.2.1	Kortikoidy	19
2.2.2	Imunosuprese	20
2.2.3	Biologická léčba	20
2.2.4	Makrolidová antibiotika.....	21
2.3	Polyketidy	23
2.3.1	Manumycin A, manumycin B.....	23
2.3.2	Colabomycin E	25
2.3.3	Asukamycin A	25
2.3.4	Asukamycin D	26
2.3.5	β -rubromycin	27
2.3.6	Deoxynybomycin.....	27
2.4	Principy použitých metod	29
2.4.1	Stanovení životnosti buněk - Vi-CELL XR.....	29
2.4.2	Průtoková cytometrie.....	29
2.4.3	Luminex	31
2.4.4	Elektronická biosenzorová technologie - xCELLigence systém	32
2.4.5	Reverzně transkripční PCR.....	33
3	Cíle práce.....	34
4	Materiál a metody.....	35
4.1	THP-1 buněčná linie	35
4.1.1	Rozmrazování THP-1 buněčné linie.....	35
4.1.2	Pasáž THP-1 buněk.....	36
4.1.3	Příprava THP-1 buněk na pokus	36
4.2	Metodika	37
4.2.1	Příprava polyketidů a makrolidů.....	37

4.2.2	Příprava ostatních látek.....	37
4.2.3	Měření životnosti THP-1 buněk	38
4.2.4	Stanovení apoptických THP-1 buněk	39
4.2.5	Stimulace THP-1 buněk.....	39
4.2.6	Měření exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách	40
4.2.7	Stanovení koncentrace cytokinů a chemokinů.....	40
4.2.8	Stanovení proliferace THP-1 buněk	42
4.2.9	Stanovení genové exprese.....	42
4.3	Statistika.....	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Měření životnosti THP-1 buněk.....	45
5.2	Stanovení apoptických THP-1 buněk.....	45
5.3	Stimulace THP-1 buněk	48
5.4	Měření exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách	56
5.5	Stanovení koncentrace cytokinů a chemokinů	59
5.6	Stanovení proliferace THP-1 buněk.....	63
5.7	Stanovení genové exprese	74
6	Diskuze	75
7	Souhrn.....	83

Seznam zkratek

7-AAD	7-aminoactinomycin D
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
APC	Antigen presenting cell; buňka prezentující antigen
As A	Asukamycin A
As D	Asukamycin D
Azi	Azithromycin dihydrate
CD	Cluster of differentiation; diferenciační antigen
Cla	Clarithromycin
Co E	Colabomycin E
Deo	Deoxybomycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetal bovine serum, fetální bovinní sérum
FITC	Fluorescein thioisocyanate, fluorescein thioisokyanát
FS	Forward scatter; přední rozptyl
G-CSF	Granulocyte - colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie granulocytů
GTP	Guanosine-5'-triphosphate; guanosin-5'-trifosfát
HLA	Human leukocyte antigen; lidský leukocytární antigen
HMOX1	heme oxygenáza 1
ICAM	Intercellular adhesion molecule; mezibuněčná adhezivní molekula
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IL1R1	Interleukin 1 receptor, typ I
I κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
LPS	Lipopolysaccharide, lipopolysacharid
Ma A	Manumycin A
Ma B	Manumycin B
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12
PBS	Phosphate buffered saline; fosfátový pufr
PMA	forbol-12-myristate-13-acetat
Rb	β -rubromycin
SS	Side scatter; boční rozptyl
TCR	T cell receptor; T buněčný receptor
Th	Helper lymphocyt; pomocný lymfocyt
TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2
TLR	Toll-like receptor
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNF α	Tumor necrosis factor alpha; faktor nekrotizující nádory alfa

1 Úvod

Nedílnou součástí imunitního systému jsou cytokiny, které jsou označovány jako základní regulátory imunitních reakcí. Prozánětlivé cytokiny se účastní na rozvoji zánětu, což je fyziologický děj při porušení integrity organismu. Pokud akutní zánět přejde v chronický, jedná se zpravidla o patologický stav. Chronický zánět je působen přehnanou reakcí imunitního systému například proti vlastním antigenům, což vede k rozvoji autoimunitního onemocnění či naopak přemrštěně reaguje na zcela běžné látky, v tomto případě alergeny. U obou případů je potřeba imunitní systém utlumit, k tomu jsou používána různá protizánětlivá nebo imunosupresivní léčiva či se u těžkých forem zavádí biologická léčba. Protizánětlivý účinek mají i některá antibiotika, například makrolidy, které se uplatňují při léčbě zánětů horních a dolních cest dýchacích, kožních, gastrointestinálních a genitálních infekcí. Jejich využití jako protizánětlivých léků je však limitováno rizikem vzniku bakteriální rezistence, což by znemožnilo jejich antibiotické využití. Proto jsou studovány polyketidy, bioaktivní látky bez antibiotického účinku získané od různých producentů.

Jedním z nejvýznamnějších mikroorganismů produkujících sekundární metabolity je třída Actinobacteria. Je snaha co nejvíce pochopit tyto mikroorganismy a získat tak co nejvíce užitečných látek. Mezi nejaktivnější producenty patří grampozitivní bakterie rodu *Streptomyces*. Mnoho jejich sekundárních metabolitů vykazuje antibakteriální, protinádorové, antifungální a cytotoxické vlastnosti. S rozvojem genetického inženýrství došlo k odhalení velkého počtu tak zvaných tichých biosyntetických genových klastrů v genomech aktinomycety. Tyto klastry kódují sekundární metabolity, které nejsou detekovány za standardních fermentačních podmínek. Nové poznatky jsou využity pro efektivnější získávání nových metabolitů. V lékařství jsou tyto přírodní látky považovány za bezpečnější než sloučeniny, které jsou vyrobené synteticky.

Svou diplomovou práci jsem zpracovávala v Institutu klinické a experimentální medicíny na oddělení klinické imunologie. Co se týče této problematiky, pracoviště se zabývá testováním sekundárních metabolitů bakterií rodu *Streptomyces* od roku 2006. Spolupracující laboratoř na MBÚ na Akademii věd ČR studuje tyto látky již 20 let. Konkrétně jsou zkoumána polyketidová antibiotika, která se vyznačují antibakteriálními, antimykotickými, protivirovými, protinádorovými a imunosupresivními účinky.

2 Přehled literatury

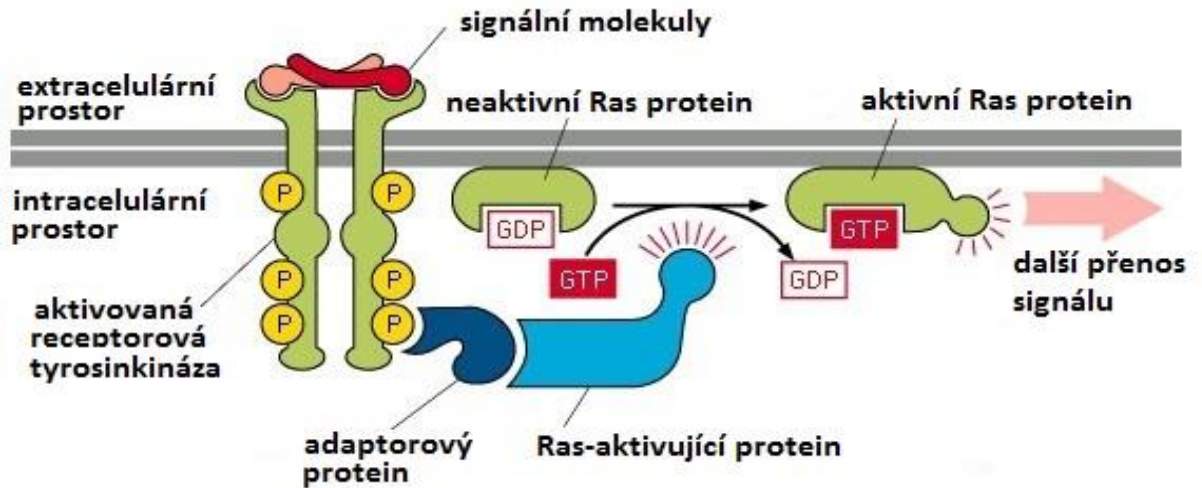
2.1 Prozánětlivé cytokiny a jejich regulace

Cytokiny hrají velmi důležitou roli při imunitní odpovědi. Pokud se jedná o protizánětlivé cytokiny, je už z názvu zřejmé jejich uplatnění při rozvoji zánětlivé reakce. Mnoho těchto cytokinů je přítomna v cytoplazmě buněk ve formě prekurzorů, proto se mohou v imunitní odpovědi uplatnit během několika minut až hodin. Z cytokinového prekurzoru se pomocí specifických proteáz stává aktivní forma, která může být ihned sekretována do okolí. Prozánětlivé cytokiny jsou produkovány především monocyty, makrofágy a epiteliálními buňkami. Tyto buňky mezi prvními rozeznávají činitele narušujícího celistvost tkáně. Mikroorganismy jsou identifikovány pomocí povrchových receptorů (Toll-like receptory) či intracelulárních receptorů (NOD-like receptory). Sekrece cytokinů může být též vyvolána jinými mediátory uplatňující se při zánětu či nekróze, například změna teploty, chemické a fyzikální látky či dokonce mechanická síla. K rozvoji a zesílení zánětlivé reakce jednoznačně přispívá autokrinní regulace cytokinů. Buňky se dostávají do místa poškození na podnět chemotaktických cytokinů - chemokinů. Při průchodu do tkáně se uplatňují adhezivní molekuly, které se nachází jak na buňkách tak endotelu. Prozánětlivé cytokiny se však neuplatňují jen v imunitním systému, ale také působí na buňky CNS na jejichž povrchu se také nachází specifické receptory pro cytokiny. Výsledkem je pak řada klinických příznaků objevujících se zejména u chronických zánětlivých onemocnění (DINARELLO 2000).

2.1.1 TNF α

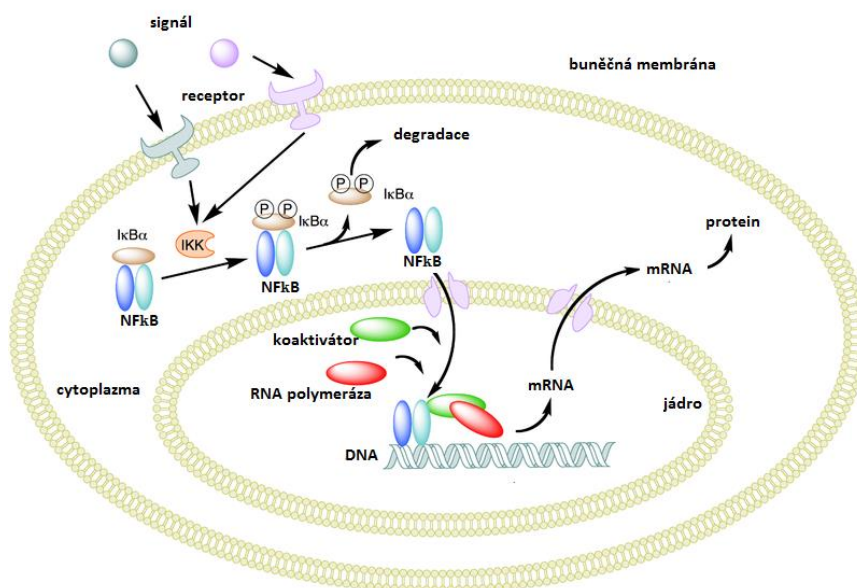
TNF α je řazen do zánětlivých cytokinů a je produkován především makrofágy. Lidský gen se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21,3). Tento prozánětlivý cytokin je trimer složený ze tří identických proteinových řetězců. Prekurzor proteinu je aktivován pomocí TACE (TNF-alpha converting enzyme). Aktivní molekula je vázána k buněčné membráně krátkou transmembránovou částí. Pokud dojde k působení metaloproteináz TNF α se z membrány uvolňuje. Membránová i solubilní forma se váže na TNFRSF1A/TNFR1 (CD120a) a TNFRSF1B/TNFR2 (CD120b) buněčné receptory a následně dochází k aktivaci Ras/MAPK signální dráhy (Obr. č.1) a NF-kappa B proteinového komplexu, který funguje

jako transkripční faktor (Obr. č.2). Tímto způsobem $TNF\alpha$ indukuje produkci dalších prozánětlivých cytokinů. Specifické receptory pro $TNF\alpha$ jsou též asociovány s prokaspázami, což vede ke spuštění kaspázové kaskády vedoucí k apoptóze cílových buněk.



Obr. č. 1: Převzato z ALBERTS *et al.* 1997

Signální molekula se naváže na receptor, čím dochází k aktivaci receptorových tyrosinkináz, ty aktivují adaptorový protein, který následně aktivuje Ras protein a tím spouští reakce při které dochází k postupné aktivaci celé řady MAP kináz. Ty následně aktivují genové regulační proteiny, které regulují genovou expresi. Výsledkem je buněčná proliferace a diferenciace.



Obr. č. 2: Převzato z <http://www.biomol.com/>

Přes extracelulární signály dojde k aktivaci I-kappa B kinázy (IKK), která fosforyluje inhibiční protein I-kappa B α nacházející se v cytoplazmě v komplexu s NF-kappa B. I-kappa B α je degradován a tím dojde k aktivaci NF-kappa B. Aktivní NF-kappa B se dostává do jádra, kde se váže na specifické sekvence DNA a má funkci transkripčního faktoru.

TNF α má celou řadu funkcí, kdy se dříve myslelo, že se podílí výhradně na indukci apoptózy nádorových buněk čemuž odpovídá název cytokinu. Při fyziologické koncentraci se TNF α uplatňuje při udržování homeostázy, cirkadiálního rytmu, podporuje reparační funkce fibroblastů. Při patologických reakcích TNF α funguje jako účinný pyrogen. Stimuluje buňky k produkci IL-1, podporuje pohyb neutrofilních buněk a makrofágů do místa zánětu a tím se podílí na rozvoji zánětlivé reakce. TNF α je klíčový faktor při rozvoji septického šoku a účastní se při rozvoji kachexie (JANEWAY *et al.* 1999, NIE *et al.* 2013). Cytokin má schopnost proliferaci buď stimulovat či inhibovat, záleží na dané situaci. Zatímco u zánětlivé reakce TNF α indukuje aktivaci neutrofilních buněk, při navázání na TNF-R55 receptor dochází k indukci apoptózy (MURRAY *et al.* 1997). Jelikož se TNF α uplatňuje při řadě patologických reakcí, našla své uplatnění anti-TNF α monoklonální protilátka, která snižuje působení či plně inhibuje účinek TNF α (BEUTLER *et al.* 1985).

2.1.2 IL-1 β

IL-1 se nachází ve dvou formách IL-1 α a IL-1 β . Nejprve jsou oba syntetizovány v neaktivní formě. U člověka je IL-1 β kódován genem IL1B nacházející se na dlouhém raménku 2. chromozomu (2q14) a dává vzniknout prekurzoru IL-1 β , který je štěpen cytoplazmatickou kaspázou 1 za následného vzniku funkčního IL-1 β . K fázi dozrávání dochází v multiproteinovém buněčném komplexu, který je nazýván inflamasom. IL-1 β je produkován aktivními monocyty a makrofágy. (DINARELLO 2009). Specifický receptor pro IL-1 β je velmi podobný imunoglobulinům a některým adhezivním molekulám. Po navázání IL-1 β specifický receptor se aktivuje adaptorový protein MyD88, molekuly IRAK a dochází k aktivaci transkripčního faktoru MAPK p38, současně dochází i k aktivaci NF-kappa B (AHMAD *et al.* 2007). IL-1 indukuje expresi desítek až stovek genů, které v klidovém stavu nejsou exprimovány. Podílí se na produkci prozánětlivých cytokinů zejména IL-6 a TNF α (YANAGIDA *et al.* 2004), indukuje produkci chemokinů a adhezivních molekul na endotelu (ZACHLEDEROVÁ a JEROLIM 2006). Specifické receptory pro IL-1 β se nachází téměř

na všech buňkách lidského těla. Pokud se tedy IL-1 β nachází ve vyšších koncentracích, může mít až systémový účinek (DINARELLO 2005).

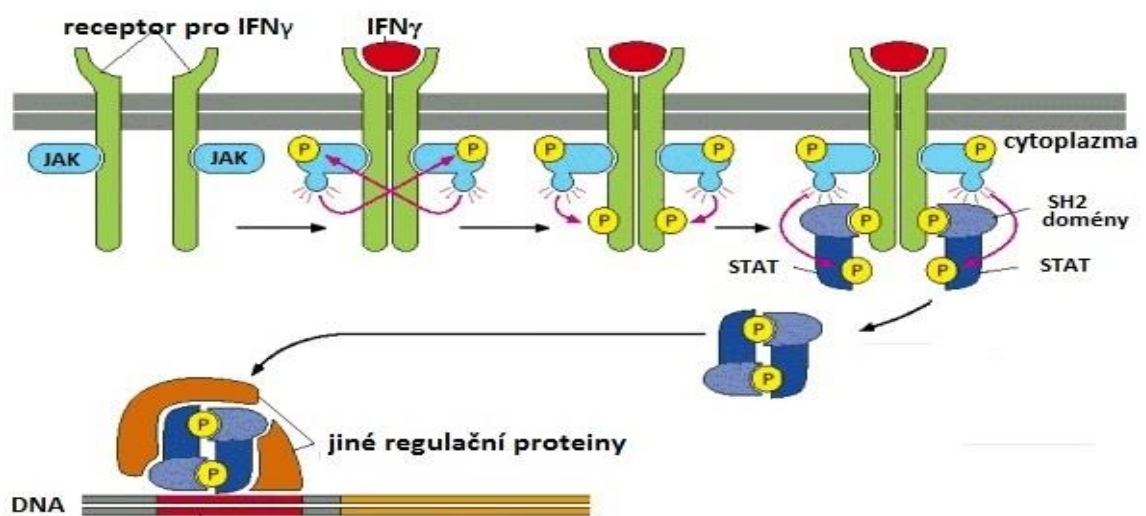
2.1.3 IL-6

IL-6 představuje zásadní cytokinové propojení mezi imunitním, endokrinním a centrálním nervovým systémem (HORRI *et al.* 1988). U lidí je kódován genem IL6 ležící na krátkém raménku 7. chromozomu (7p21). Specifické receptory pro IL-6 patří mezi receptory I. typu. Mají podobnou strukturu jako imunoglobuliny či fibronektiny. Skládají se z krátkého α -řetězce a dlouhého β -řetězce. Forma tohoto receptoru může být jak membránová tak solubilní (GARDES *et al.* 2012). IL-6 je produkován zejména aktivovanými monocyty, makrofágy a T-lymfocyty a epitelovými buňkami. IL-6 se podílí na diferenciaci T-lymfocytů, u B-lymfocytů podporuje produkci protilátek, aktivuje NK buňky a uplatňuje se při dozrávání myeloidních buněk (SIMPSON *et al.* 1997). Jedná se o endogenní pyrogen vyvolávající horečku nejen u zánětů, ale také u autoimunitních chorob a zároveň indukuje tvorbu proteinů akutní fáze. IL-6 se tvoří v místě jak akutního tak chronického zánětu odkud je vyplavován do krevní plazmy, kde se dá stanovit jeho zvýšená koncentrace (BANKS *et al.* 1994). Vyšší koncentrace IL-6 byla také pozorována u lidí s obezitou (BASTARD *et al.* 1999). V jiné studii se uvádí, že vysoká koncentrace byla nalezena naopak u lidí s vyšší fyzickou aktivitou, kdy je IL-6 vyplavován přímo z buněk kosterního svalstva (FEBBRAIO a PEDERSEN 2005). Zvýšené hodnoty IL-6 byly také zaznamenány u lidí v pokročilém stádiu nádorového onemocnění (LI *et al.* 2012).

2.1.4 IFN γ

IFN γ patří do rodiny interferonů II. třídy a účastní se celé řady imunoregulačních reakcí (SCHRODER *et al.* 2004). U lidí je kódován genem, který se nachází na dlouhém raménku 12. chromozomu (12q14). IFN γ se váže na specifický receptor, který je tvořen dvěma IFNGR1 řetězci a dvěma IFNGR2 řetězci. Tyto receptory jsou v cytoplazmatické části asociovány s JAK1 a JAK2 kinázami (SADIR *et al.* 1998). JAK jsou tyrosinproteinkinázy,

které po aktivaci fosforylují transmembránové receptory. Na fosforylované receptory nasedají STAT proteiny, které jsou také fosforylovány JAK kinázami. Následně se STAT proteiny z receptoru uvolní a dostávají se do jádra, kde mají funkci transkripčních faktorů, tedy regulují genovou expresi (Obr. č. 3) (LIU et al. 2008). Je produkován zejména NK buňkami a T- lymfocyty CD4 i CD8. Podílí se na vývoji a aktivaci Th1 lymfocytů, aktivaci monocytů, chemotaxi, zvyšuje expresi molekul HLA I. I II. třídy a účastní se isotypového přesmyku u B- lymfocytů. Vykazuje antivirové, antiproliferační a apoptické účinky (SCHOENBORN a WILSON 2007).



Obr. č. 3 převzato z ALBERTS *et al.* 1997

IFN γ se váže na specifické receptory. Po jeho navázání dochází k přiblížení receptorů a vzájemné aktivaci JAK tyrosinproteinových kináz, které se navzájem fosforylují. Následně JAK kinázy fosforylují receptory na které se přes SH2 doménu naváží STAT proteiny a též dojde k jejich aktivaci. Aktivované STAT proteiny se uvolní z receptoru a dimerizují mezi sebou pomocí SH2 skupin. V tomto stavu se dostávají do jádra, kde s jinými regulačními proteiny nasedají na specifické sekvence DNA.

2.2 Terapeutické potlačení prozánětlivých cytokinů

Akutní zánět je možno považovat za fyziologickou reakci imunitního systému, ale pokud zánětlivá reakce přechází do chronického stádia, jedná se již o patologický jev. Jelikož mají cytokiny velký vliv na rozvoj zánětlivé reakce je léčba soustředěna mimo jiné na snížení koncentrací prozánětlivých cytokinů.

2.2.1 Kortikoidy

Kortikoidy jsou synteticky vyráběné steroidní hormony podobné hormonu kortizol, který patří do skupiny glukokortikoidů. Kortizol je u obratlovců vyráběn v kůře nadledvin a v těle se uplatňuje při řadě fyziologických pochodů. Účastní se při zvládnutí dlouhodobé stresové situace, tlumí imunitní systém, čímž reguluje i zánětlivé reakce, zvyšuje hladinu krevního cukru (HIGASHI *et al.* 2011). Kortikoidy tlumí funkci transkripčních faktorů, které se podílejí na genové expresi prozánětlivých cytokinů. Výsledek je snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů a od toho se odvíjí snížená proliferace a funkce buněk, které na cytokiny reagují. Celkově dochází ke snížení exprese adhezivních molekul jak na epitelových buňkách tak buňkách imunitního systému, potlačení chemotaxe, fagocytózy, respiračního vzplanutí a uvolňování dalších zánětlivých mediátorů. Kortikoidy jsou využívány pro svůj imunosupresivní účinek při artritidě (YAZDANY *et al.* 2014), u těžkých dermatitid, u těžkých alergických stavů, astmatu (NORMAN *et al.* 2013), při zánětlivých onemocnění střev jako je například Crohnova choroba, u autoimunitních chorob (KWAK *et al.* 2014) a dalších onemocnění, kde je potřeba potlačit imunitní systém. Kortikoidy pouze tlumí symptomy choroby. Po vysazení těchto léků se projevy onemocnění velmi rychle znovu projevují. Kortikoidy tlumí imunitní systém jako celek. Jedince, kterému jsou tyto látky podávány dlouhodobě je náchylnější k infekcím a též má zvýšené riziko výskytu nádorového onemocnění. Nebezpečí hrozí při dlouhodobém podávání kortikoidů, kdy tělo může přestat vyrábět své vlastní kortikosteroidy. V tomto případě vysazení těchto léků může mít fatální následek (ARONSON 2010).

2.2.2 Imunosuprese

Imunosuprese je stav, kdy došlo ke snížení funkce imunitního systému v důsledku imunosupresivní léčby. Těchto léků se využívá při léčbě autoimunitních chorob, zánětlivých onemocnění neautoimunitního původu, pokud pacient neodpovídá na léčbu kortikoidy. Při transplantaci orgánů a tkání, kdy je u příjemce potřeba snížit reakci imunitního systému proti transplantátu. Tyto léky inhibují aktivaci T-lymfocytů, narušují buněčné dělení tím, že dochází k narušení syntézy DNA a RNA, tlumí produkci prozánětlivých cytokinů. Mezi nežádoucí účinky patří hlavně utlumení imunitního systému jako celku, což vede jako u kortikoidů k náchylnosti k infekcím a hrozí zvýšené riziko nádorového onemocnění (SAYEGH a REMUZZI 2001).

2.2.3 Biologická léčba

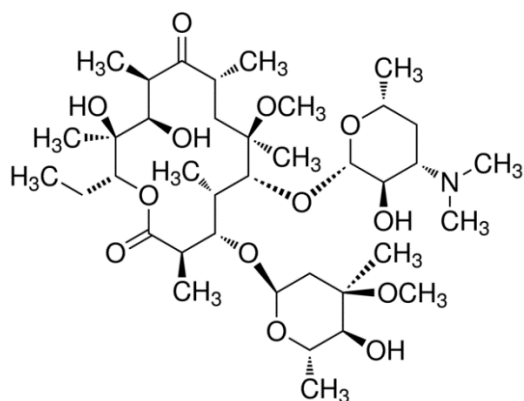
Biologická léčba je brána jako moderní přístup k léčbě mnoha nemocí. Biologická léčba je využívána především u léčby nádorových onemocnění (STAREN *et al.* 1989) a autoimunitních chorob, zánětlivých střevních onemocnění jako je Crohnova choroba či ulcerózní kolitida (RUTGEERTS *et al.* 2006). Velkou výhodou je zaměření se na konkrétní buňky imunitního systému či cytokin, což nesnižuje funkci imunitního systému jako celku (PALLONE a MONTEONE 1996). Při této léčbě jsou využívány polyklonální i monoklonální protilátky. Některé polyklonální protilátky se váží na T-lymfocyty a aktivují komplement, to vede k lýze buňky. Takto poškozená buňka je odstraněna fagocytárními buňkami pryč z krevního řečiště. Tak dochází ke snížení imunitní reakce zprostředkované buněčnou imunitou (ROMAGNANI 1999). I zde je však zvýšené riziko určitých infekcí. U takto léčených pacientů se může také vyskytnout sérová nemoc či imunokomplexová glomerulonefritida. Monoklonální protilátky jsou zaměřeny na konkrétní antigen v tomto případě cytokin. Imunitní odpověď je ovlivněna podle toho, jaký cytokin je protilátkou inhibován. Protilátky mohou být též namířeny proti receptorům pro daný cytokin. Tím dochází k zablokování receptoru a cytokin se již nemá kam navázat a buňku nemůže stimulovat k další akci (CHAUDHARI *et al.* 2001).

2.2.4 Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika se vyznačují antibakteriálním účinkem proti grampozitivním kokům. Makrolidy narušují syntézu proteinů vazbou na 23S rRNA v 50s ribosomální podjednotce, čímž blokuje růst mikroorganismů. Grampozitivní bakterie citlivé na makrolidová antibiotika se často způsobují kožní a gastrointestinální infekce, infekce horních a dolních cest dýchacích a infekce genitální. Tyto antibiotika mají schopnost akumulovat ve tkáních i buňkách imunitního systému zejména v monocytech a makrofázích (JAIN a DANZIGER 2004). Během posledních let bylo zjištěno, že některé tyto makrolidy mají též imunomodulační účinek. Dochází k potlačení zánětlivé reakce, aniž by byla snížena funkce imunitního systému. Makrolidová antibiotika mají vliv na MAPK signalizační dráhu, především přes kinázu ERK1/2 současně ovlivňují NF-kappa B, čímž se vysvětluje celá řada imunomodulačních účinků (KANO a RUBIN 2010).

2.2.4.1 Clarithromycin

Clarithromycin patří mezi makrolidová antibiotika se středně širokým spektrem účinku na různé bakteriální druhy. Clarithromycin se dnes používá k léčení infekcí horních cest dýchacích (faryngitida, sinusitida), dolních cest dýchacích (pneumonie, bronchitida) dále lze antibiotikem léčit mírné až střední infekce kůže a měkkých tkání či infekce způsobené bakterií *Helicobacter pylori*, které se podílejí na vzniku duodenálních vředů (<http://farmaceutika.info/>). Dalšími pokusy bylo zjištěno, že clarithromycin se podílí na zlepšení funkce makrofágů, kdy došlo ke zlepšení chemotaxe i fagocytózy in vitro (GAO *et al.* 2010). Naproti tomu došlo ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 a IL-8 produkovaných makrofágy, což je důsledek snížené aktivity NF-kappa B (IVES *et al.* 2001, KIKUCHI *et al.* 2002). Clarithromycin má též schopnost u lidských epiteliálních buněk potlačit vstup z G1 fáze do S fáze čímž zamezuje proliferaci buněk. Zde pravděpodobně dochází k inhibici MAPK signální dráhy přes ERK 1/2 (SHINKAI *et al.* 2006). Antibiotikum má pravděpodobně schopnost dostávat se do buněk, kde se následně akumuluje. Výhoda tohoto děje může být to, že se látka dostane do místa zánětu, kam je transportována prostřednictvím již zmíněných makrofágů (BOSNAR *et al.* 2005).

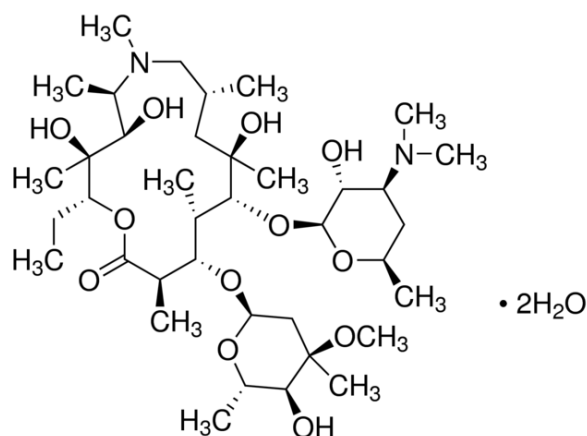


Obr. č. 4

Struktura clarithromycinu
 molekulární hmotnost: 747,95
 sumární vzorec: $C_{38}H_{69}NO_{13}$

2.1.2.2 Azithromycin dihydrate

Azithromycin dihydrate patří také mezi makrolidová antibiotika a používá se při léčbě infekcí horních a dolních cest dýchacích, při akutní ušní infekci, infekci kůže a měkkých tkání, při infekci močové trubice a děložního hrdla, která je způsobena chlamydiemi (<http://farmaceutika.info/>). U azithromycinu dihydrate je známý imunomodulační účinek, ale jeho mechanismy nejsou zcela jasné (IKEGAYA *et al.* 2009). Při testování tohoto antibiotika byla zjištěna nižší exprese prozánětlivých cytokinů $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ a $IL-6$ v supernatantech různých buněčných kultur oproti kontrolním vzorkům (TONG *et al.* 2011). Azithromycin dihydrate má mnohem lepší schopnost akumulace v buňkách než clarithromycin, tedy i on může být transportován pomocí buněk do místa zánětu (LEMAIRE *et al.* 2009).



Obr. č. 5

Struktura Azithromycinu dihydrate
 molekulární hmotnost: 785,02
 sumární vzorec: $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$

2.3 Polyketidy

Polyketidová antibiotika jsou mikrobiální přírodní produkty, které jsou produkovány některými kmeny Aktinomycet (BUNET *et al.* 2014). Aktinomycety jsou grampozitivní bakterie tvořící širokou škálu sekundárních metabolitů s různými vlastnostmi, které se využívají mimo jiné také jako farmaceuticky cenné sloučeniny (OLANO *et al.* 2014). Sekundární metabolity mají antibakteriální, antimykotické, protivirové a protinádorové, imunosupresivní účinky. Tyto látky mohou mít také antihypertenzní a antihypercholesterolemické vlastnosti (OMURA *et al.* 2001).

Dnes se zcela běžně používají některé sekundární metabolity Aktinomycet jako je například erythromycin s antibiotickým působením, vankomycin s protinádorovou aktivitou či rapamycin s imunosupresivními vlastnostmi (ZIEMERT *et al.* 2014).

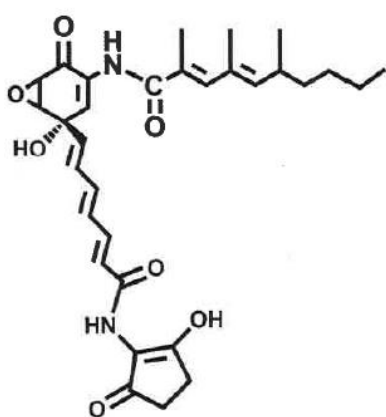
Aktinomycety produkují určité sekundární metabolity přirozeně proti jiným organismům či jako ochranu před nepříznivými podmínkami (MEHRA *et al.* 2008). S vývojem genového inženýrství se začalo geneticky manipulovat i s těmito kmeny bakterií za účelem získat další biologicky aktivní sekundární metabolity (OLANO *et al.* 2014). Využívá se rekombinace DNA pro zvýšení počtů biosyntetických genových klastrů bioaktivních metabolitů. Předpokládá se, že některé kmeny mají více než 20 genových klastrů, avšak ne každý klastr kóduje jiný sekundární metabolit (UEKI *et al.* 2013). Polyketidová antibiotika jsou syntetizována polyketidsyntázou, kdy tato reakce je velmi podobná syntéze mastných kyselin (CHOPRA *et al.* 2008). V literatuře se též uvádí, že množství sekundárních metabolitů se dá zvýšit různou koncentrací DMSO v bakteriální kultuře. Způsob účinku DMSO není znám, ale předpokládá se, že působí již na translační úrovni (CHEN *et al.* 2000). Relativně málo studovanou skupinou polyketidů představují antibiotika manumycinového typu.

2.3.1 Manumycin A, manumycin B

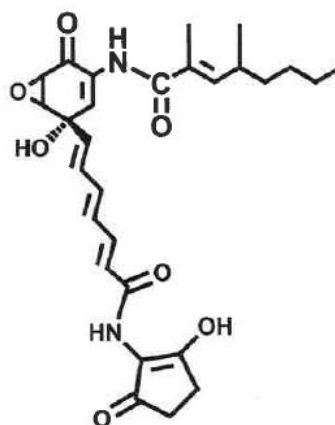
Manumycin A i manumycin B jsou prozatím nejlépe prozkoumané sekundární metabolity různých kmenů Aktinomycet, alespoň tedy mezi látkami, které jsem v rámci své diplomové práce testovala. Jedná se o přírodní antibiotikum, které je produkováno bakteriemi *Streptomyces parvulus* (kmen Aktinomyceta). Je prokázáno, že manumycin A i manumycin B inhibují funkci Ras farnesyltransferázy (SAČKOVÁ *et al.* 2011). Ras proteiny patří do velké rodiny malých GTP-vázajících proteinů s jednou podjednotkou, které se často

nazývají monomerní GTP-vázající proteiny (ALBERTS *et al.* 1997). Ras proteiny mají důležitou roli v signální dráze buněk, která se uplatňuje například při proliferaci. Při vzniku mutace Ras proteinu hrozí maligní transformace buněk (SINGHA *et al.* 2013). Tyto specifické Ras inhibitory snižují funkci I-kappa B kináz, které při normální funkci přes řadu reakcí aktivují NF-kappa B proteinový komplex (BERNIER *et al.* 2006). Tento proteinový komplex se dostává po své aktivaci do jádra, kde funguje jako transkripční faktor, který má klíčovou roli při imunitní odpovědi, proliferaci a diferenciaci buněk (OECKINGHAUS a GHOSH 2009). Nesprávná regulace NF-kappa B je spojena s chronickým zánětlivým procesem, rozvojem septického šoku, virovým onemocněním, nádorovým onemocněním, s autoimunitními chorobami (PERKINS 2007). Z toho vyplývá, že při působení manumycinu A i manumycinu B jakožto Ras inhibitoru, který ovlivňuje funkci I-kappa B kináz, dochází ke snížení proliferace buněk a k inhibici zánětu. Manumycin A i manumycin B též indukují apoptózu přes kaspázu 3 a nově se zjistilo, že i přes kaspázu 9 a mají cytotoxický účinek. Těchto vlastností by se dalo využít při léčbě maligních onemocnění (BERNIER *et al.* 2006, KOHNO *et al.* 1996, LI *et al.* 2014).

Protinádorový účinek manumycinu A i manumycinu B byl zatím experimentálně prokázán u buněk lidského tlustého střeva, u nádorových buněk pankreatu, u nádorových buněk štítné žlázy, u nádorových buněk lymfoidní a myeloidní linie, u meduloblastomu, u leukemických buněk U937 a buněk HL-60 a u lidského karcinomu hepatocelulárních HepG2 buněk (SAČKOVÁ *et al.* 2011).



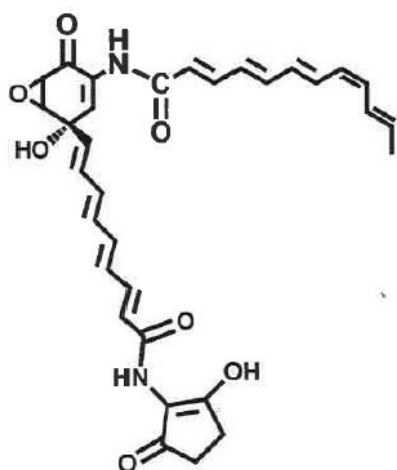
Obr. č. 6
Struktura manomycinu A
molekulární hmotnost: 550,64
sumární vzorec: C₃₁H₃₈N₂O₇



Obr. č. 7
Struktura manomycinu B
molekulární hmotnost: 510,58
sumární vzorec: C₂₈H₃₄N₂O₇

2.3.2 Colabomycin E

Colabomycin E patří mezi sekundární metabolity manumycinového typu, které jsou produkovány bakteriemi *Streptomyces aureus*. Tato látka inhibuje produkci IL-1 β z THP-1 buněk, což naznačuje, že colabomycin E může být potencionálním protizánětlivým prostředkem (PETŘÍČKOVÁ *et al.* 2014).

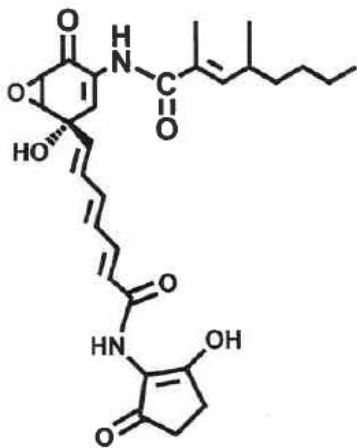


Obr. č. 8

Struktura colabomycinu E
molekulární hmotnost: 556,61
sumární vzorec: C₃₂H₃₂N₂O₇

2.3.3 Asukamycin A

Asukamycin A také spadá do skupiny manumycinových antibiotik a je produkován bakterií *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* ATCC 29757. Asukamycin A vykazuje antibakteriální aktivitu, konkrétně proti grampozitivním bakteriím (OMURA *et al.* 1976). Též se vyznačuje antifungální a protinádorovou aktivitou (XIE *et al.* 2012). Asukamycin vykazuje silnou inhibici farnesyltransferázy, I-kappa B kinázy stejně jako je tomu u manumycinů A i B a snižuje produkci IL-1 β jako je tomu u colabomycinu E. Asukamycin A díky této schopnosti je považován za vhodného budoucího kandidáta nejen při léčbě zánětů, maligních onemocnění, ale také například Alzheimerovi choroby (RUI *et al.* 2010). V jiné studii se poukazuje na schopnost asukamycinu A aktivovat kaspázy 3 a 8. Za velkou výhodou může být brána nízká cytotoxicita in vivo tohoto sekundárního metabolitu (SHIPLEY *et al.* 2009).

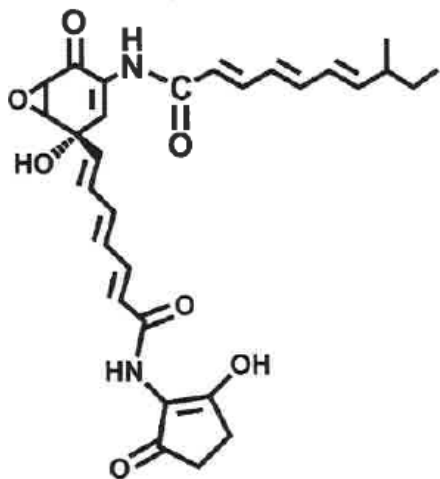


Obr. č. 9

Struktura asukamycinu
molekulární hmotnost: 546,61
sumární vzorec: $C_{31}H_{34}N_2O_7$

2.3.4 Asukamycin D

Asukamycin D je produkován *Streptomyces sp.* E-1511. Tento sekundární metabolit je inhibítoem IL-1 β konvertujícího enzymu, má tedy protizánětlivé vlastnosti a také působí jako antibakteriálně (TANAKA *et al.* 1996, UOSAKI *et al.* 1996)

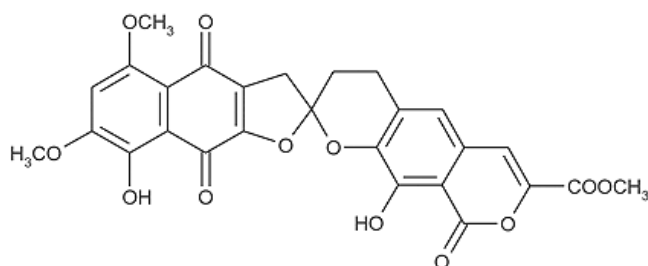


Obr. č. 10

Struktura asukamycinu D
molekulová hmotnost: 520,57
sumární vzorec: $C_{29}H_{32}N_2O_7$

2.3.5 β -rubromycin

β -rubromycin je sekundární metabolit, který byl izolován z různých kmenů Aktinomyces za posledních 60 let a vyznačuje se antimikrobiální aktivitou (ATKINSON a BRIMBLE 2015). Bylo zjištěno, že β -rubromycin má schopnost inhibovat aktivitu lidských telomeráz, což by mohlo mít velký přínos při léčbě nádorových onemocnění (MIZUSHINA *et al.* 2012). V jiné studii se uvádí, že rubromycin funguje jako inhibitor retroviróvé reverzní transkriptázy a též inhiboval činnost savčích DNA polymeráz *in vitro* (MIZUSHINA *et al.* 2000). Komerčně dostupný β -rubromycin je uváděn jako selektivní inhibitor HIV-1 reverzní transkriptázy (<http://www.abcam.com/>). V jiném článku se uvádí, že tento sekundární metabolit měl inhibiční účinky na reverzní transkriptázy, ne však už na DNA a RNA polymerázy a ani na DNA topoizomerázy a deoxyribonukleázy. Další výzkum prokázal nesespecifickou cytotoxicitu β -rubromycinu a také jeho působení snižuje proliferaci nádorových buněk (UENO *et al.* 2000).



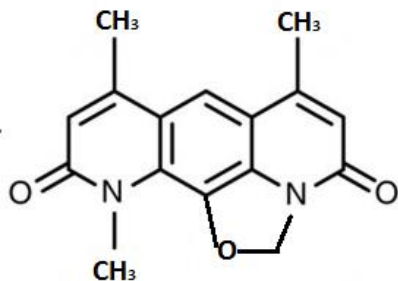
Obr. č. 11

Struktura β -rubromycinu
molekulární hmotnost: 536,44
sumární vzorec: $C_{27}H_{20}O_{12}$

2.3.6 Deoxybomycin

Deoxybomycin je produkován bakteriemi Streptomyces. U tohoto mycinu bylo prokázáno působení proti růstu nádorových buněk u leukemické buněčné linie THP-1, u osteoblastického sarkomu na buňkách Saos-2 a u karcinomu žaludku na buňkách TMK-1. Také se zjistila selektivní cytotoxicita proti plicní nádorové buněčné linii. Zároveň neovlivňuje normální životaschopnost a růst lidských fibroblastů. Deoxybomycin má schopnost indukovat apoptózu, inhibuje topoizomerázu I, ale inhibice topoizomerázy II. nebyla

prokázána. Díky těmto vlastnostem je deoxynybomycin vhodným kandidátem pro léčbu nádorových onemocnění (EGAWA *et al.* 2000, PARKINSON *et al.* 2015).



Obr. č. 12

Struktura deoxynybomycinu
molekulární hmotnost: 282,29
sumární vzorec: C₁₆H₁₄N₂O₃

2.4 Principy použitých metod

2.4.1 Stanovení životnosti buněk - Vi-CELL XR

Analyzátozem Vi-CELL XR je měřena životnost a počet buněk. Životnost je stanovena pomocí vitálního barvení trypanovou modří. Pokud je buňka životaschopná, nemá porušenou buněčnou membránu a trypanová modř se do buňky nedostane. U mrtvé buňky dochází k rozrušení membrány a barvička se dostává do cytoplazmy, kterou obarví. Výhodou je snímání buněčné populace CCD kamerou, což se na obrazovce jeví jako simulace odečítání z Bürkerovy komůrky. Analyzátor vyhodnocuje koncentraci buněk, procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk a velikost buněk (www.beckmancoulter.com).

K analýze je potřeba minimálně 1 ml buněčné suspenze, proto měření životnosti buněk na Vi-CELL XR bylo prováděno pouze při pasáži a přípravě buněk na pokus. Pro měření životnosti v rámci pokusu byl použit průtokový cytometr.

2.4.2 Průtoková cytometrie

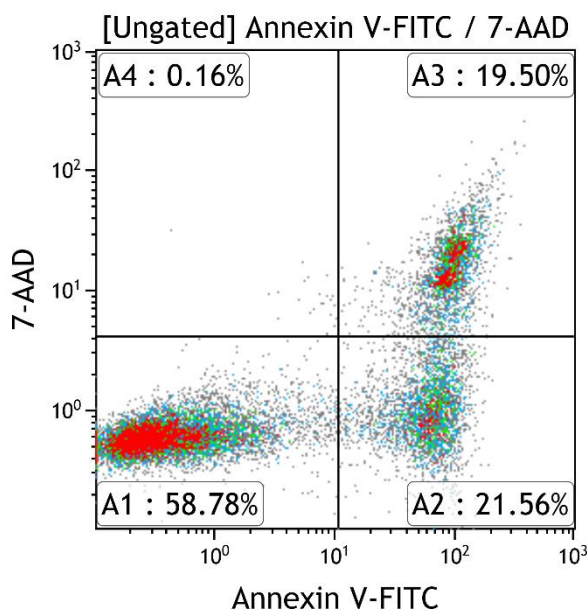
Průtoková cytometrie slouží k analýze buněk v buněčné suspenzi. Přístroj má 3 hlavní části: fluidní systém, optická část a část elektronická. Pomocí tlaku (fluidní systém) jsou buňky jedna po druhé hnány do prostoru, kde dochází ke křížení procházející buňky a paprsku monochromatického laseru. K detekci buněk se využívá rozptyl světla, které vzniká při střetu buňky a paprsku. V průtokové cytometrii se rozptyl světla rozděluje na forward scatter (FS) a side scatter (SS). Jako forward scatter je označován přímý rozptyl světla (úhel 2°-13°), který je úměrný velikosti analyzované buňky. Naproti tomu boční rozptyl světla (úhel 90°), side scatter dává informaci o granularitě měřené buňky. Současně dochází k detekci povrchových či intracelulárních znaků na buňce. Na sledovaný znak se naváže specifická protilátka značená fluorescenčním barvivem, které absorbuje světlo o určité vlnové délce vyzářené laserem. Fluorescenční barvivo následně emituje část absorbovaného světla. Emitované světlo je zachyceno detektorem (optická část). Z detektorů je optický signál převeden na elektrický, který je digitalizován pro počítačovou analýzu (elektronická část) (BARTŮŇKOVÁ *et al.* 2011, SHAPIRO 2005)

2.4.2.1 Životnost buněk

K měření životnosti buněk s pomocí průtokové cytometrie se využívá propidium jodid. V případě, že je buňka mrtvá, prochází tato fluorescenční barvička skrz porušenou membránu buňky a váže se na DNA. Pokud je buňka živá, propidium jodid se do buňky přes membránu nedostane a buňka zůstává neobarvená.

2.4.2.2 Apoptóza buněk

Pro detekci buněk živých, v časně apoptóze, v pozdní apoptóze a nekrotických se využívá detekce navázaného annexinu V a 7-aminoactinomycinu D (7-AAD). Annexin se váže na fosfatidyl serin, který se u živé buňky nachází na vnitřní straně buněčné membrány. Annexin neprochází buněčnou membránou, a proto se u živé buňky na fosfatidyl serin nemůže navázat. U buněk v časně apoptóze buněčná membrána ztrácí integritu a fosfatidyl serin se dostává na vnější stranu membrány. Dochází k navázání annexinu. 7-AAD má schopnost se dostávat do buňky, kde se váže na DNA (na páry bází guanin-cytosin). Živá buňka má schopnost 7-AAD aktivně pumpovat ven z buňky a tak nedochází k jeho navázání na DNA v buňce. Pokud je navázán annexin V i 7-AAD, buňka se nachází v pozdní apoptóze. Při navázání jen 7-AAD je buňka nekrotická.



Obr. č. 13

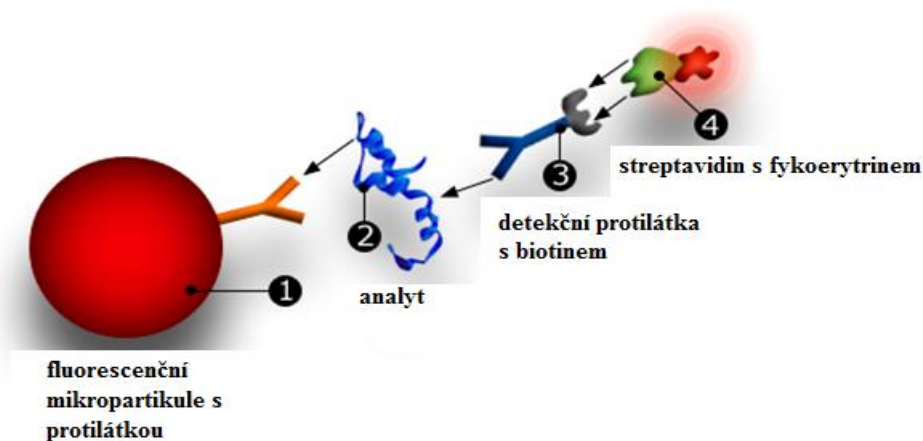
Detekce buněk živých (A1), v časně apoptóze (A2), v pozdní apoptóze (A3) a nekrotických (A4). Značeno annexinem V / 7-AAD.

2.4.2.3 Povrchové znaky

Jak už bylo zmíněno výše, pro sledování povrchových znaků na buňkách je potřeba použít specifické monoklonální protilátky, které jsou značeny fluorescenční barvičkou. Monoklonální protilátka se během inkubace naváže na receptor. Buňky, které na svém povrchu nenesou sledovaný antigen, jsou vyhodnoceny jako negativní. Naopak buňky nesoucí sledovaný antigen jako pozitivní. Analýzou jsou získána data jako procentuální zastoupení negativních/pozitivních buněk či denzita exprimovaného receptoru na povrchu buňky (SHAPIRO 2005).

2.4.3 Luminex

Základem metody jsou specifické protilátky, které jsou navázány na mikropartikelky označené fluorochromem. Tyto mikropartikelky jsou přidány ke vzorkům a dochází k navázání analytu na specifické protilátky. V následujícím kroku je přidána specifická detekční protilátka, na které je navázán biotin. Protilátka s biotinem se též naváže na stanovený analyt za vzniku sendviče protilátka – analyt – protilátka. V dalším kroku je přidán streptavidin značený fluorescenční značkou fykoerytrinem. Polystyrénové kuličky jsou detekovány přístroji, které využívají dvou laserů. Jeden laser detekuje fluorochrom mikročástice specifický pro analyt, čímž dochází k identifikaci analytu. Druhý laser detekuje velikost signálu fykoerytrinu, který je přímoúměrný množství navázaného analytu. K měření se používají Luminex® 100™, Luminex 200™ nebo Bio-Rad® Bio-Plex® analyzátoary (JAGER *et al.* 2003, <https://www.rndsystems.com/>).



Obr. č. 14
Princip metody Luminex

2.4.4 Elektronická biosenzorová technologie - xCELLigence systém

xCELLigence systém umožňuje sledovat chování buněk v reálném čase, až po dobu několika dní bez použití jakéhokoliv barvení či značení. Principem metody je sledování růstu buněk v takzvaných E-plates, tedy v jamkových destičkách, kde na každém dně destičky se nachází zlatá elektroda. Detekovány jsou právě buňky přisedlé na elektrodě. Pro toto měření se dají použít jen adherentní buňky či buňky, u kterých lze adhezi vyvolat určitou látkou. Princip detekce je založen na měření elektrického odporu na dně jamky. Čím více buněk přisedá na dno jamky, tím větší vzniká elektrický odpor, který je měřen. Míra elektrického odporu je vyjádřena v takzvaném buněčném indexu (bezrozměrná jednotka). Detekční přístroj se vloží do termostatu, kde jsou buňky běžně inkubovány (37 °C, 5% CO₂). Touto metodou je možné sledovat buněčnou životaschopnost, adhezi, proliferaci, diferenciaci. Během pokusu je možné k buňkám přidat různé látky, které mají schopnost ovlivnit životnost, adhezi či morfologii sledovaných buněk. Tyto změny jsou následně viditelné na křivce. Například umírání buněk se projeví snížením počtu přisedlých buněk, kdy výsledkem je pokles elektrického odporu na dně jamky. Tím dojde ke snížení hodnot buněčného indexu. Z tvaru křivky je možné také posoudit kinetiku působení přidaných látek. Touto metodou se též dá měřit migrace buněk v reálném čase. Buňky jsou stimulovány k migraci určitou látkou, buňky následně prochází přes membránu, která se nachází přímo v měřicí jamce. Po průchodu skrz membránu buňky přisedají na dno jamky a opět dochází k měření elektrického odporu (<http://www.aceabio.com/>).



Obr. č. 15
xCELLigence – vybavení: program, přístroj, destička se zlatými elektrodami

2.4.5 Reverzně transkripční PCR

Při této metodě je použita reverzní transkriptáza, která katalyzuje syntézu řetěze DNA podle komplementárního templátového řetězce mRNA. Využívají se buď primery nasedající na 3'-poly(A)-konec (není potřeba znát specifické sekvence zkoumané mRNA) či jsou použity genově specifické primery (sekvence komplementární k testované mRNA). Vzniklý řetězec cDNA (komplementární DNA) je jednovláknový a je potřeba ho převést na dvouvláknovou DNA. K tomu slouží reverzní primer, který nasedá na cDNA a nový řetězec DNA je syntetizován Taq-polymerázou. Po tomto kroku vzniká dvouvláknová cDNA, která je následně amplifikována pomocí klasické PCR (SNUSTAD a SIMMONS 2012).

3 Cíle práce

- Stanovení vlivu polyketidů na expresi povrchových znaků aktivace monocytární linie THP-1
- Posouzení vlivu polyketidů na koncentraci prozánětlivých cytokinů a chemokinů v buněčném supernatantu
- Měření buněčné proliferace za přítomnosti testovaných polyketidů
- Porovnat koncentrace prozánětlivých cytokinů a chemokinů s genovou expresí

4 Materiál a metody

4.1 THP-1 buněčná linie

THP-1 je lidská monocytární linie izolována od ročního pacienta s monocystickou leukemií. Tato linie je široce využívána při studiu funkce, mechanismů, signálních drah monocytů a makrofágů (CHANPUT *et al.* 2014). THP-1 buňky mají C3b a Fc receptory a zároveň jim chybí povrchové a cytoplazmatické imunoglobuliny (TSUCHIYA *et al.* 1980). Buňky neadherují k povrchu kultivační lahve, však po přidání forbol-12-myristate-13-acetátu či 1,25-dihydroxy vitaminů D3 začnou diferencovat a adherovat k povrchu (DAIGNEAULT *et al.* 2010). Současně dochází k indukci fagocytózy, k inhibici růstu buněk a následná změna morfologie je doprovázena zvýšenou aktivitou transglutaminázy (MEHTA a BERESTEIN 1986). Buňky jsou kultivovány v RPMI 1640 mediu s 2mM L-glutaminem, 10% FBS, 1% penicilinem a 1% streptomycinem při 37 °C s 5% CO₂.

4.1.1 Rozmrazování THP-1 buněčné linie

Buňky jsou uchovávány v tekutém dusíku při -180 °C.

1. ampule s buňkami byla přenesena v tekutém dusíku do vodní lázně
2. po rozmrazení se po kapkách přidávalo medium RPMI s glutaminem a 20% FBS do celkového objemu 20ml
3. buňky byly centrifugovány při 1300 otáčkách za minutu, 5 minut při laboratorní teplotě
4. po odstranění supernatantu byla peleta roztřepána a bylo přidáno 20ml kultivačního média – RPMI 1640 medium s 2mM L-glutaminem, 10% FBS, 1% penicilinem a 1% streptomycinem
5. buňky byly opět centrifugovány za stejných podmínek
6. po centrifugaci následovalo resuspendování buněk v kultivačním mediu
7. buňky byly přeneseny do kultivační lahve a daly se inkubovat do 37 °C s 5% CO₂.

4.1.2 Pasáž THP-1 buněk

1. buňky byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a byly centrifugovány při 1300 otáčkách za minutu, 5 minut při laboratorní teplotě
2. po slítí supernatantu byla buněčná peleta roztřepána a k buňkám bylo přidáno nové kultivační médium
3. byla změřena životnost a koncentrace buněk na buněčného analyzátoru Vi-CELL XR (Beckman Coulter)
4. koncentraci přibližně $2-9 \times 10^5$ buněk/ml

4.1.3 Příprava THP-1 buněk na pokus

1. buňky byly přeneseny do centrifugačních zkumavek a byly centrifugovány při 1300 otáčkách za minutu, 5 minut při laboratorní teplotě
2. po slítí supernatantu byla buněčná peleta roztřepána a k buňkám bylo přidáno nové kultivační médium
3. byla změřena životnost a koncentrace buněk na buněčného analyzátoru Vi-CELL XR
4. koncentrace buněk na pokus byla vždy 1×10^6 buněk/ml

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava polyketidů a makrolidů

Polyketidy a makrolidy byly dodány v pevném stavu v určitém množství (mg).

1. ke každé látce bylo přidáno 100 μ l DMSO a 900 μ l PBS s výjimkou clarithromycinu, kde se místo DMSO přidával aceton (koncentrace mycinu je mg/ml)
2. látky byly rozpíjetovány a uchovávány v mrazáku
3. před pokusem bylo k 10 μ l mycinu přidáno 990 μ l (koncentrace mycinu je μ g/ μ l)
Koncentraci DMSO bylo nutné naředit na 0,1%, jelikož je pro buňky toxické.

Výpočet koncentrace:

- myciny byly používány v koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μ M

$$m=c*V*M$$

c... výsledná koncentrace mycinu

V... celkový objem

M... molární hmotnost testovaného mycinu

μ g připraveného mycinu v 1 μ l

vypočítaná hmotnost (**m**) v X μ l

Výsledek udává kolik μ l je potřeba napipetovat z připraveného mycinu, aby byla získána požadovaná koncentrace.

4.2.2 Příprava ostatních látek

Výpočet koncentrace:

látky byly používány v koncentracích

- stimul - 10; 20; 50; 100ng/ml
- DMSO a aceton – 0,1%
- PMA – 100ng/ml

$$V1 = \frac{V2 * C2}{C1}$$

V1... napipetovaný objem ze zásobního roztoku

C1... koncentrace zásobního roztoku

V2... celkový objem

C2... požadovaná koncentrace

4.2.3 Měření životnosti THP-1 buněk

Pro zjištění zda myciny nepůsobí cytotoxicky na THP-1 buňky, byla měřena životaschopnost buněk po inkubaci s testovanými myciny. Na pokus byla použita 48 jamková inkubační destička. Celkový objem v jedné jamce činil 400 μ l. Jako kontrola sloužily samotné THP-1 buňky a THP-1 buňky s přidáním 0,1% DMSO či 0,1% acetonem. Tato kontrola se prováděla jelikož myciny byly rozpuštěny v těchto chemikáliích a v případě zjištěné cytotoxicity bylo nutné zjistit, zda jí způsobují samotné myciny či použité rozpouštědla.

1. nejprve se provedl výpočet potřebného množství použitých látek a buněk na výsledný objem 400 μ l
2. buňky a myciny byly dle vypočítaného množství napipetovány do kultivační destičky
3. nechalo se inkubovat 24h při 37 °C v 5% CO₂
4. do každé zkumavky bylo napipetováno 10 μ l propidium jodidu (BD Pharmingen™) a 100 μ l buněčné suspenze
5. nechalo se inkubovat 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě
6. po inkubaci byl přidán 1ml ředícího roztoku, aby buňky nebyly měřeny v malém objemu
7. pro měření byl použit průtokový cytometr Cyan ADP 9C - 3 lasery, 9 barev (Beckman Coulter)
8. data byla vyhodnocena pomocí Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter)

4.2.4 Stanovení apoptických THP-1 buněk

U mycinů s 5 μ M koncentrací byla zaznamenána nižší životaschopnost buněk. Proto byl proveden test, který umožnil zjistit, zda u buněk došlo k indukci apoptózy či nastala nekróza. K práci byl použit komerční kit Annexin V/7-AAD (Beckman Coulter). Veškerá práce byla prováděna na ledu.

1. kontrolní buňky a buňky s myciny byly dle vypočítaného množství napipetovány do kultivační destičky
2. nechalo se inkubovat 24h při 37 °C v 5% CO₂
3. buněčná suspenze byla přenesena do zkumavek a bylo přidáno chlazené PBS
4. centrifugováno 5min při 500 otáčkách za minutu při 4 °C
5. buněčný supernatant byl slit a buněčná peleta byla resuspendována v 150 μ l vychlazeném Binding Bufferu
6. do každé zkumavky bylo napipetovalo 10 μ l annexinu, 20 μ l 7-AAD a 100 μ l připravené buněčné suspenze
7. nechalo se inkubovat 15min ve tmě na ledu
8. po inkubaci bylo přidáno 400 μ l chlazeného Binding Bufferu
9. pro měření byl použit průtokový cytometr Cytomics FC 500 (2 lasery, 5 barev) (Beckman Coulter)
10. data byla vyhodnocena pomocí Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter)

4.2.5 Stimulace THP-1 buněk

Pro sledování inhibičních vlastností mycinů bylo nejprve potřeba najít látku, která by dostatečně stimulovala THP-1 buněčnou linii. Pro sledování stimulace byly zvoleny povrchové znaky CD54 a HLA-DR. Ke stanovení byly použity monoklonální protilátky anti-CD54 FITC a anti-HLA-DR PE (Beckman Coulter).

1. kontrolní buňky a buňky se stimuly byly dle vypočítaného množství napipetovány do kultivační destičky
2. nechalo se inkubovat 24h při 37 °C v 5% CO₂

3. do každé zkumavky bylo napipetováno 10 μ l anti-CD54 FITC, 10 μ l anti-HLA-DR PE a 100 μ l buněčné suspenze
4. nechalo se inkubovat 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě
5. po inkubaci byl přidán 1ml ředícího roztoku
6. pro měření byl použit průtokový cytometr Cyan ADP 9C
7. data byla vyhodnocena pomocí Kaluza Analysis Software

4.2.6 Měření exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách

THP-1 buňky byly stimulovány a následně byly přidány myciny. Bylo sledováno, zda vlivem mycinů dojde ke změně exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách.

1. kontrolní buňky, buňky se stimuly a buňky se stimuly plus myciny byly dle vypočítaného množství napipetovány do kultivační destičky
2. nechalo se inkubovat 24h při 37 °C v 5% CO₂
3. další postup je stejný jako u stimulace THP-1 buněk (od bodu č. 3)
4. zbytek buněčné suspenze bylo centrifugováno 5 minut při 13 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
5. supernatanty byly zamrazeny

4.2.7 Stanovení koncentrace cytokinů a chemokinů

Touto metodou bylo sledováno, zda myciny inhibují produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů u stimulovaných buněk. Ke stanovení koncentrace cytokinů a chemokinů byla použita metoda Luminex. K práci byl použit komerční kit Human Luminex Performance Assay Base Kit, Panel A (R&D Systems).

1. kontrolní i testované supernatanty byly rozmrazeny
2. připravil se promývací roztok: 20ml wash buffer + 480ml destilované vody
3. připravil se kalibrátor: 20ml Calibrator Diluent RD5K Concentrate se přidalo do 20ml destilované vody
4. příprava standardů: dle přiložené karty se naředil Standard Cocktail 1, 2 připraveným Calibrator Diluent RD5K
5. do zkumavek se připravila kalibrační řada:
jako blank (S0) byl použit připravený Calibrator Diluent RD5K
S1 - 300μl Calibrator Diluent RD5K + 100μl Standard Cocktail 1 + 100μl Standard Cocktail 2
S2 až S7 - 200μl Calibrator Diluent RD5K
Z S1 se do S2 přeneslo 100μl roztoku, S2 do S3 a dále se přenášel roztok až do S7
6. příprava mikropartikulí: na každou jamku se počítalo 5μl Micropartikule IL + 50μl Micropartikule Diluent
7. mikrotitrační destička obsahovala membránu, kterou bylo nutno navlhčit - 100μl promývacího roztoku do každé jamky
8. promývací roztok byl odsát na odsávače
9. do destičky se po 50μl napipetovaly standardy i vzorky
10. ke standardům i vzorkům bylo přidáno po 50μl připravených mikropartikulí
11. destička byla přikryta stříbrnou fólií a vše se nechalo inkubovat 3 hodiny na třepače při laboratorní teplotě
12. mezitím byl připraven Biotin Antibody Cocktail: na každou jamku se počítalo 5μl Biotin Antibody Concentrate IL + 50μl Antibody Diluent
13. po inkubaci se vše 3x promylo – do všech jamek bylo v každém promývacím kroku napipetováno 100μl, promývací roztok se vždy odstranil pomocí odsávačky
14. následně byl napipetován po 50μl připravený Biotin Antibody Cocktail
15. destička se přikryla stříbrnou fólií a nechalo se inkubovat 1 hodinu na třepače při laboratorní teplotě
16. připravil se streptavidin-PE: na každou jamičku se počítalo 5μl streptavidin-PE + 50μl promývacího roztoku
17. po inkubaci se vše 3x promylo
18. do všech jamek byl přidán po 50μl připravený streptavidin-PE
19. nechalo se inkubovat 30 minut na třepače při laboratorní teplotě
20. vše se 3x promylo promývacím roztokem

21. vzorky se resuspendovaly ve 100 μ l promývacího roztoku a byly přepipetovány do měřicí destičky
22. měřilo se na přístroji Luminex® 100™

4.2.8 Stanovení proliferace THP-1 buněk

Další test měl podat informace o tom, zda myciny ovlivňují proliferaci THP-1 buněk. K měření buněčné proliferace byla použita elektronická biosenzorová technologie xCELLigence systém. Nedílnou součástí byl program RTCA Software 1.2.1.

1. Buňky byly dle vypočítaného množství napipetovány do speciálních destiček
2. do každé jamky byl dle vypočítaného množství přidán PMA (pro adhezenci buněk)
3. destičky se vložily do přístroje a inkubovalo se 1 hodinu 37 °C v 5% CO₂
4. po inkubaci byly přidány stimuly a myciny a vše se nechalo inkubovat za stejných podmínek po dobu 72 hodin
5. výsledky měření byly v reálném čase

4.2.9 Stanovení genové exprese

Reverzně transkripční PCR bylo testováno, zda změna koncentrace měřených cytokinů a chemokinů koreluje se změnou koncentrace mRNA pro dané cytokiny. Genová exprese měla být testována u vybraných mycinů, dle změřených koncentracích pomocí metody Luminex. Však u této metody došlo během práce k technickým potížím a některé vzorky byly znehodnoceny. Je potřeba tyto výsledky brát pouze za orientační a metodu je nutno zopakovat. Během vypracovávání diplomové práce se již metoda neopakovala, jelikož se jedná o finančně náročnou metodu. Zároveň je potřeba dostatečný počet vzorků, aby se vyplatilo metodu z finančního hlediska provést. Měření genové exprese v rámci své práce provedla Mgr. Eva Čechrdlová a výsledky byly se souhlasem použity i do této diplomové práce. K izolaci mRNA byl použit komerční kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen). Pro stanovení genové exprese byl použit komerční kit RT² Profiler PCR Arrays - Common Cytokines Array Kit a přístroj ABI 7900HT.

Izolace mRNA

1. kontrolní buňky a buňky se stimuly byly dle vypočítaného množství napipetovány do kultivační destičky
2. nechalo se inkubovat 4 a 8 hodin při 37 °C v 5% CO₂
3. buněčná suspenze byla cetrifugována 5 minut při 2 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
4. supernatanty byly zmrazeny
5. k buňkám bylo přidáno odpovídající množství lyzátu Buffer RLT Plus (dle tabulky)
6. suspenze se scentrifugovala 3 minuty při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
7. supernatant se byl přenesen na Eliminator spin kolonu se zkumavkou
8. vzorek byl centrifugován 30 vteřin při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
9. kolona byla odstraněna a ke vzorku byl přidán 70% etanol
10. do RNeasy Mini spin kolony se zkumavkou bylo napipetováno 700μl vzorku
11. centrifugovalo se po dobu 15 sekund při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
12. po centrifugaci byla zkumavka nahrazena novou
13. do kolony bylo napipetováno 700μl Buffer RW1
14. centrifugovalo se po dobu 15 sekund při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
15. do kolony bylo napipetováno 500μl RPE a centrifugovalo se po dobu 15 sekund při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
16. do kolony bylo napipetováno 500μl RPE a centrifugovalo se 2 minuty při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
17. po centrifugaci byla zkumavka nahrazena novou a centrifugovalo se při plné rychlosti po dobu 1 minuty
18. po centrifugaci byla zkumavka nahrazena novou do kolony bylo napipetováno 40μl RNase-free water (k eluci RNA)
19. centrifugovalo se 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě

Kvalita RNA byla měřena spektrofotometrem při absorbanci 230, 260 a 280nm. Vzorky s poměrem $A_{230} / A_{260} > 1.7$ a $A_{260} / A_{280} > 1,9$ byly považovány za vhodné pro kvantitativní real-time PCR analýzu (qRT-PCR).

Reverzně transkripční PCR

1. PCR směs byla připravena do zkumavky při laboratorní teplotě (96 vzorků)
 - 2x RT² SYBR Green Mastermix 1350 μ l
 - cDNA synthesis reaction 102 μ l
 - RNase-free water 1248 μ l
2. do každé jamky měřicí destičky se napipetuje 25 μ l PCR směsi + 0,5 μ g RNA
3. vzorky byly v destičce stočeny 1 minutu při 11 000 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě
4. cykly
 - 1x 10 minut/95°C
 - 40x 15 sekund/95°C
30-40 sekund/55°C
30 sekund/72°C
5. data byla vyhodnocena pomocí webového programu, který je poskytnut výrobcem

4.3 Statistika

Pro statistické vyhodnocení byl použit párový t-test a Bonferroniho korekce hladin významnosti.

$$p \leq 0,05 *$$

$$p \leq 0,01 **$$

$$p \leq 0,0001 ***$$

5 Výsledky

5.1 Měření životnosti THP-1 buněk

Pro zjištění zda myciny nepůsobí cytotoxicky na THP-1 buňky, byla měřena životaschopnost buněk po inkubaci s testovanými myciny. Testován byl manumycin A, manumycin B, colabomycin E, asukamycin A, asukamycin D, β -rubromycin, deoxynybomycin, clarithromycin a azithromycin dihydrate. Používané koncentrace mycinů byly 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μ M. U všech koncentrací kromě 5 μ M byla zachována životaschopnost buněk. Životnost buněk se pohybovala mezi 97% a 98%.

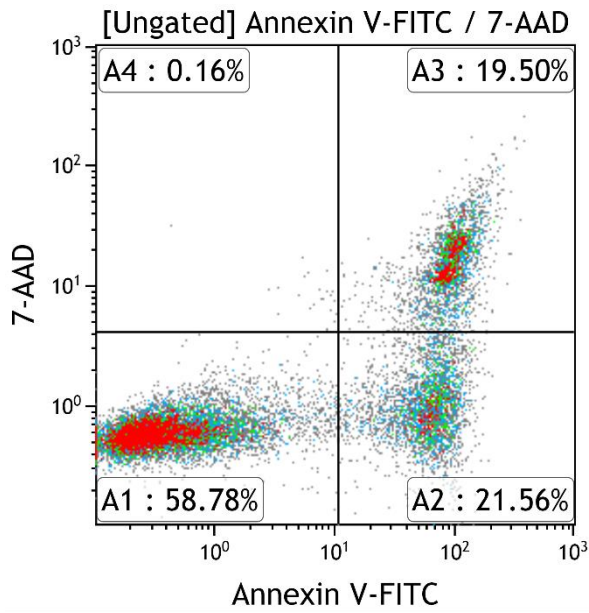
5.2 Stanovení apoptických THP-1 buněk

U mycinů s koncentrací 5 μ M. byl zaznamenán pokles živých buněk. Na základě toho byl proveden test, který umožnil zjistit, zda u buněk došlo k indukci apoptózy či nastala nekróza.

Legenda:

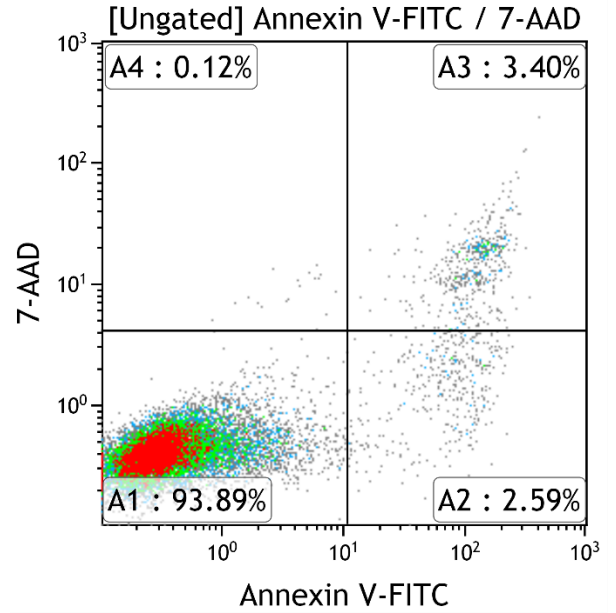
- A1 - živé buňky
- A2 - buňky v časně apoptóze
- A3 – buňky v pozdní apoptóze
- A4 - nekrotické buňky

Manumycin A



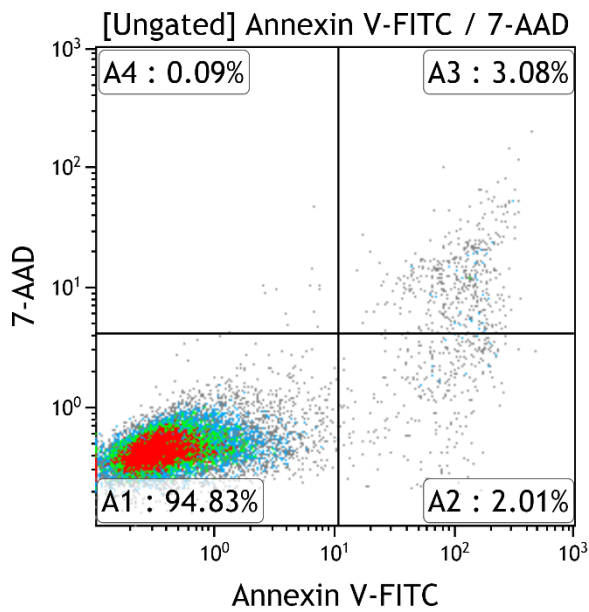
Obr. č. 16
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Ma A

Manumycin B



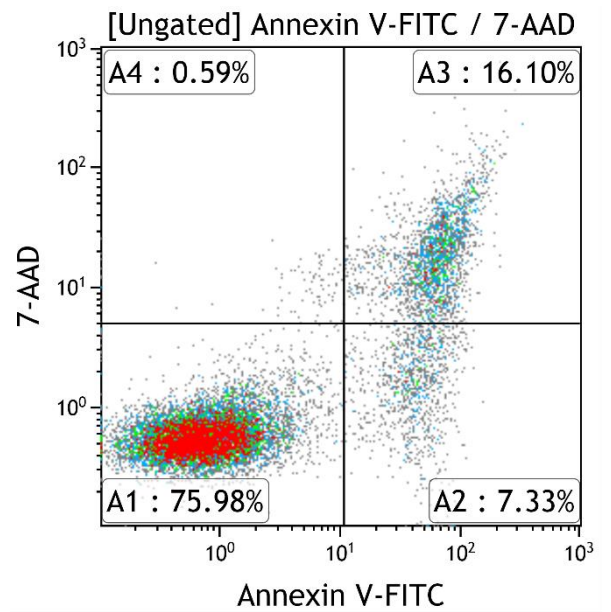
Obr. č. 17
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Ma B

Colabomycin E



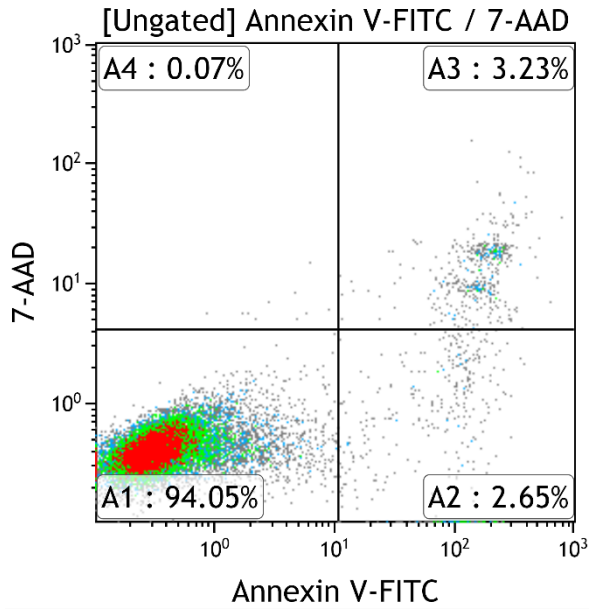
Obr. č. 18
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Co E

Asukamycin A



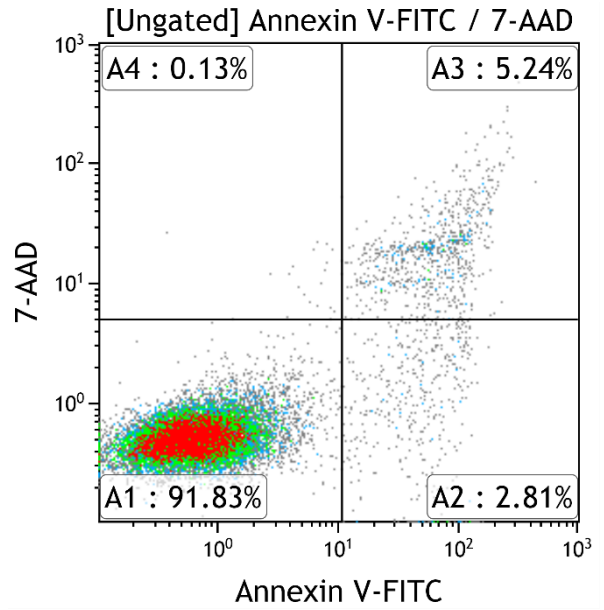
Obr. č. 19
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M As A

Asukamycin D



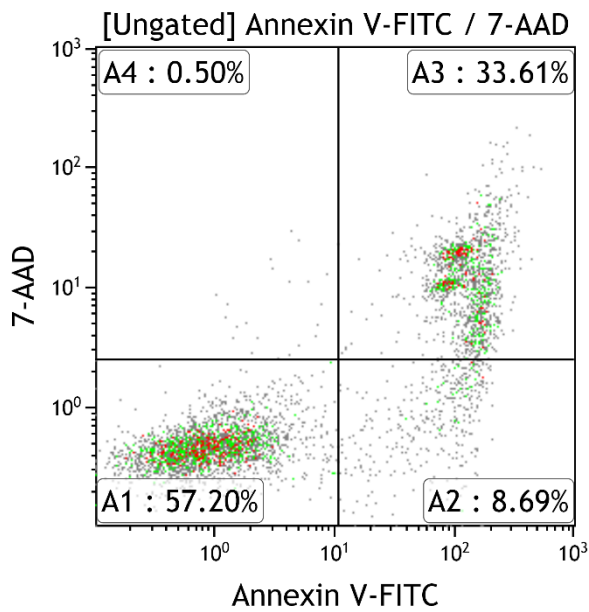
Obr. č. 20
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M As D

β -rubromycin



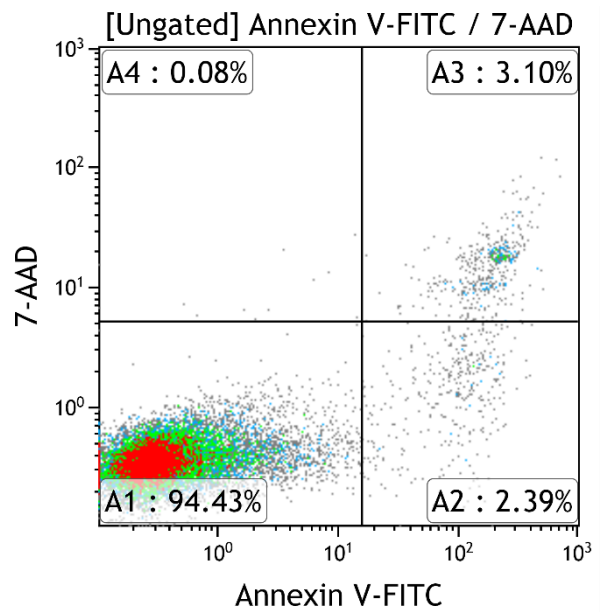
Obr. č. 21
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Rb

Deoxybomycin



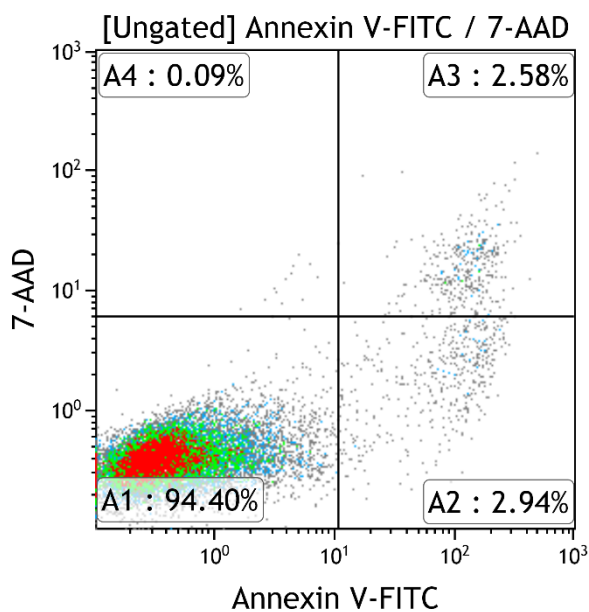
Obr. č. 22
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Deo

Clarithromycin



Obr. č. 23
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Cla

Azithromycin dihydrate

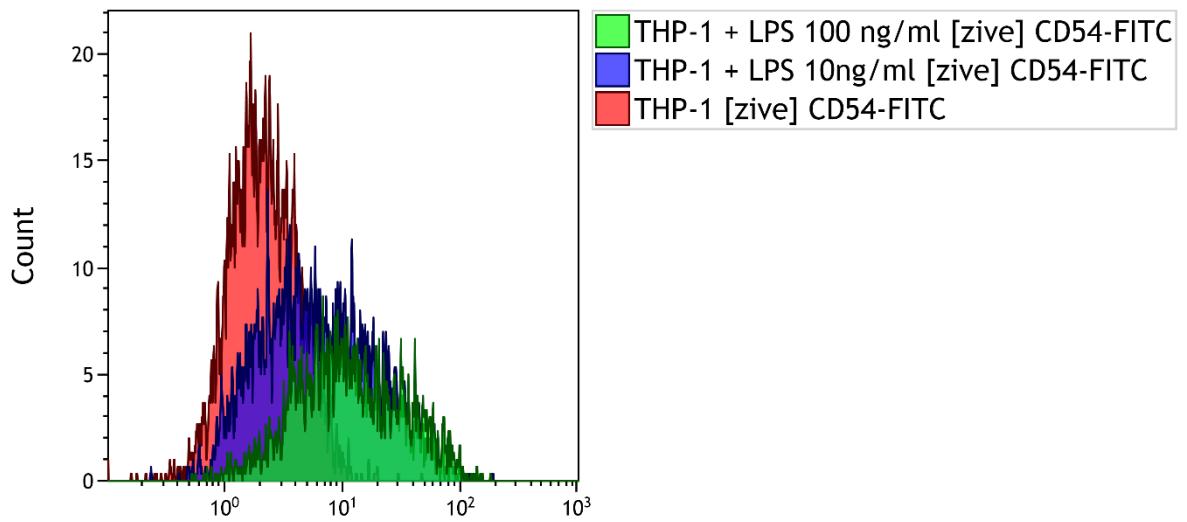


Obr. č. 24
THP-1 buňky po inkubaci s 5 μ M Azi

5.3 Stimulace THP-1 buněk

Pro sledování inhibičních vlastností mycinů bylo nejprve potřeba najít látku, která by dostatečně stimulovala THP-1 buněčnou linii. Testován byl LPS, IL-13, IL-17, IFN γ a TNF α . Používané koncentrace stimulů byly 10; 20; 50; 100ng/ml. Sledované povrchové znaky byly CD54 a HLA- DR. Pro lepší přehled grafů jsou uvedeny jen koncentrace 10 a 100ng/ml. Procento udává procentuální zastoupení pozitivních buněk pro daný znak a mean denzitu sledovaného znaku.

LPS - povrchový znak CD54

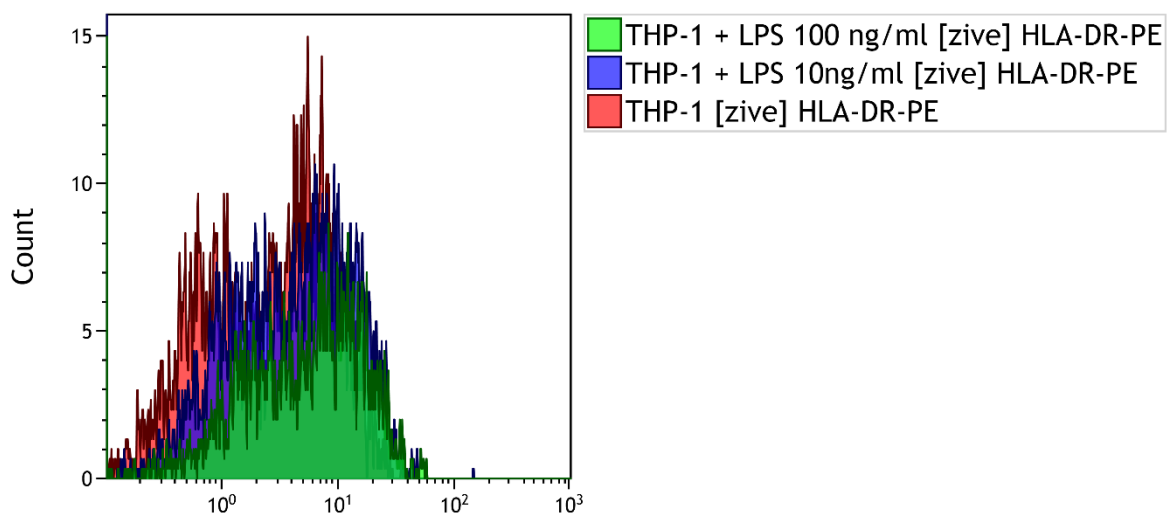


Marker	%Total	X-AMean
All	82.52	19.09
All	90.12	11.00
All	94.95	2.76

Obr. č. 25

THP-1 buňky stimulovány LPS – povrchový znak CD54
LPS buňky stimuloval, ale zároveň působil cytotoxicky.

LPS - povrchový znak HLA-DR

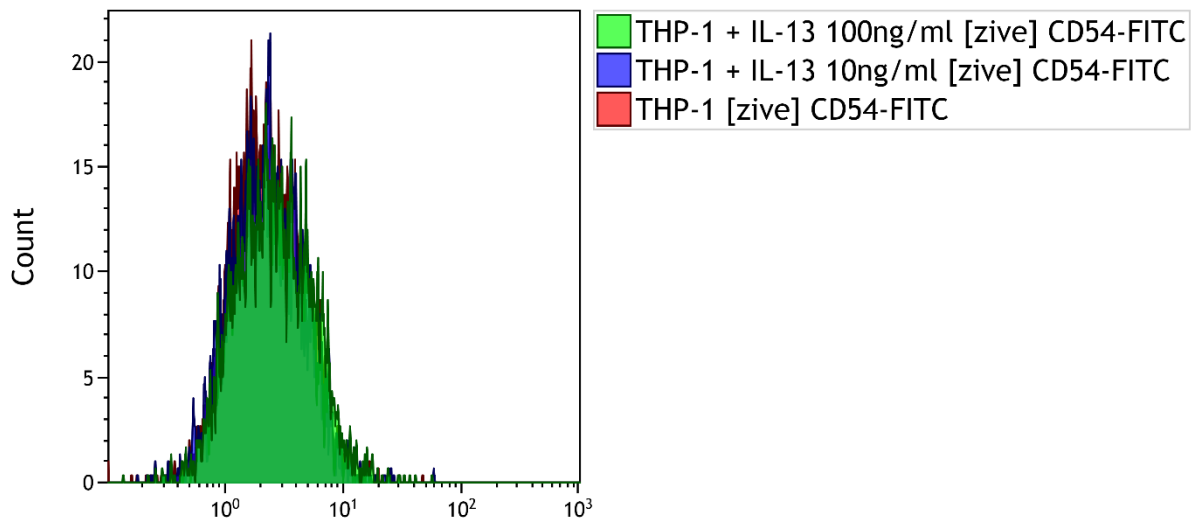


Marker	%Total	X-Med
All	82.52	5.76
All	90.12	4.40
All	94.95	2.80

Obr. č. 26

THP-1 buňky stimulovány LPS – povrchový znak HLA-DR

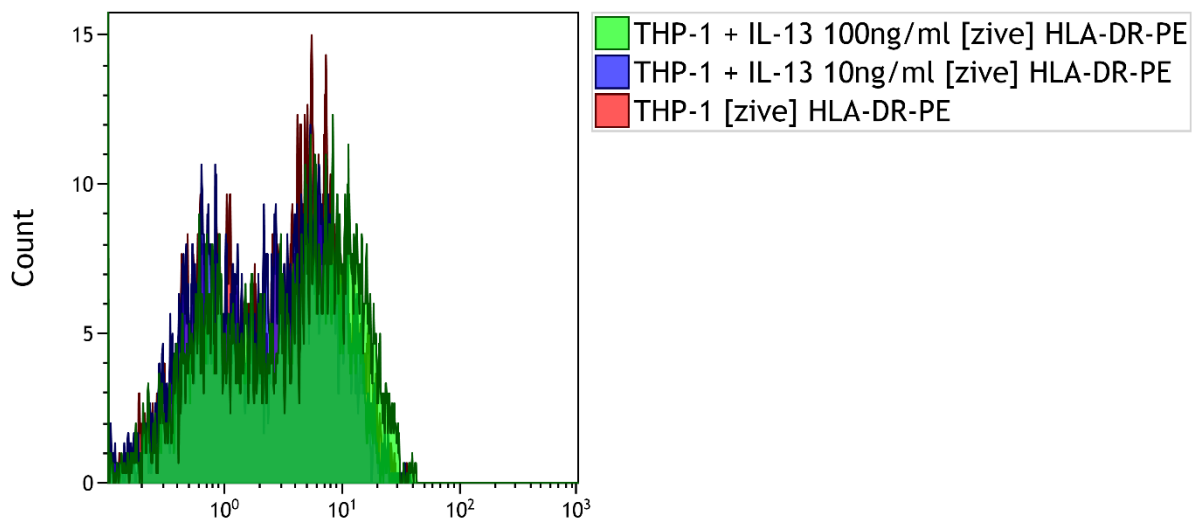
IL-13 - povrchový znak CD54



Marker	%Total	X-AMean
All	93.60	3.39
All	95.31	2.96
All	94.95	2.76

Obr. č. 27
THP-1 buňky stimulovány IL-13 – povrchový znak CD54

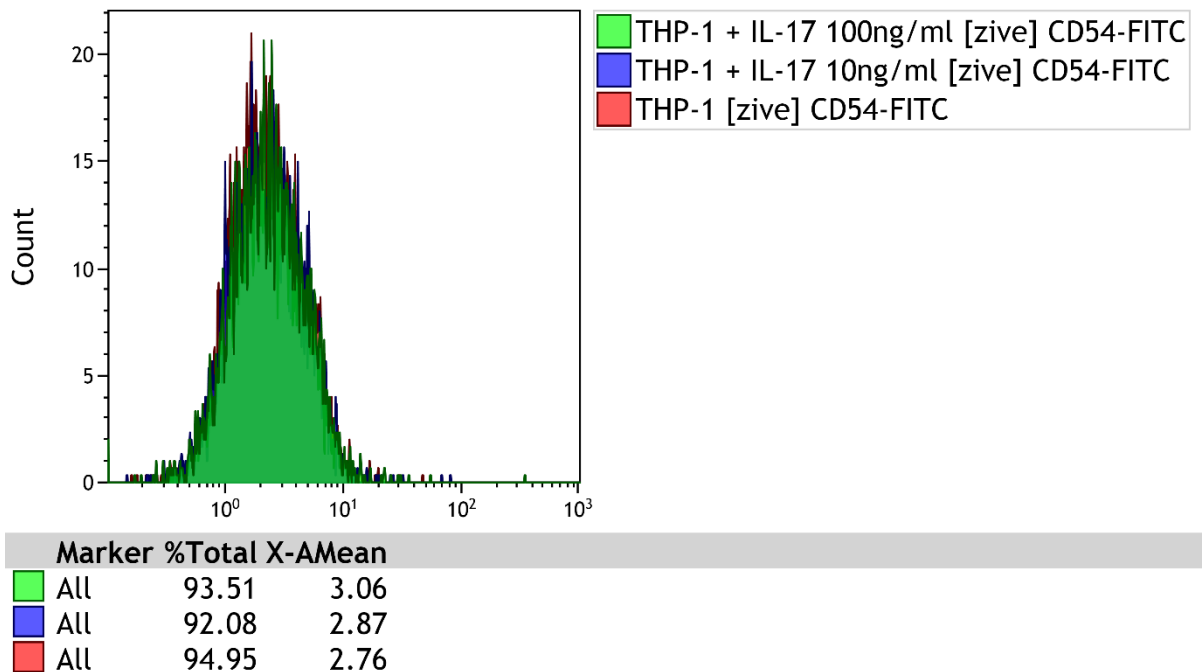
IL-13 - povrchový znak HLA-DR



Marker	%Total	X-AMean
All	93.60	6.07
All	95.31	4.14
All	94.95	4.42

Obr. č. 28
THP-1 buňky stimulovány IL-13 – povrchový znak HLA-DR

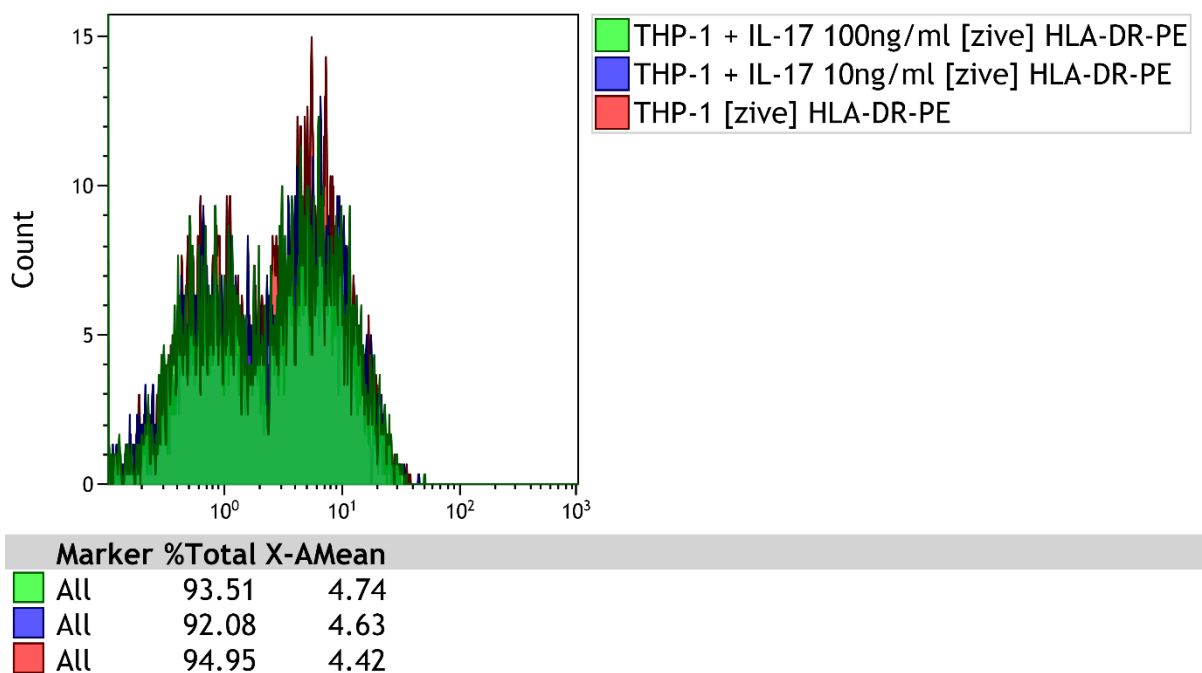
IL-17 - povrchový znak CD54



Obr. č. 29

THP-1 buňky stimulovány IL-17 – povrchový znak CD54

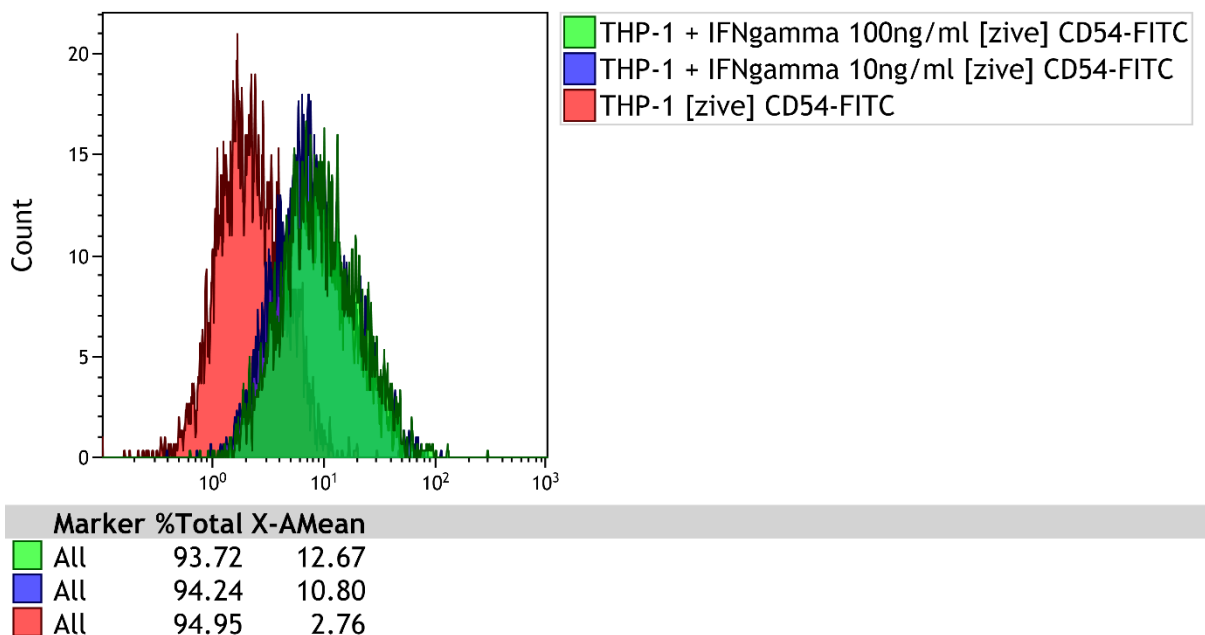
IL-17 – povrchový znak HLA-DR



Obr. č. 30

THP-1 buňky stimulovány IL-17 – povrchový znak HLA-DR

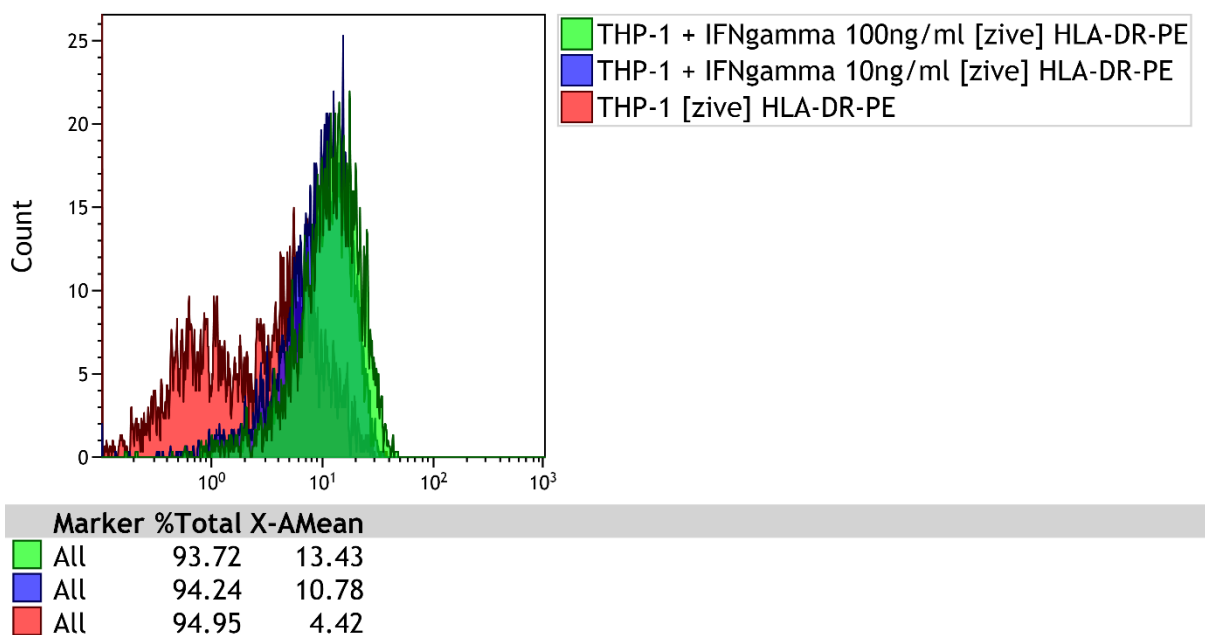
IFN γ – povrchový znak CD54



Obr. č. 31

THP-1 buňky stimulovány IFN γ – povrchový znak CD54

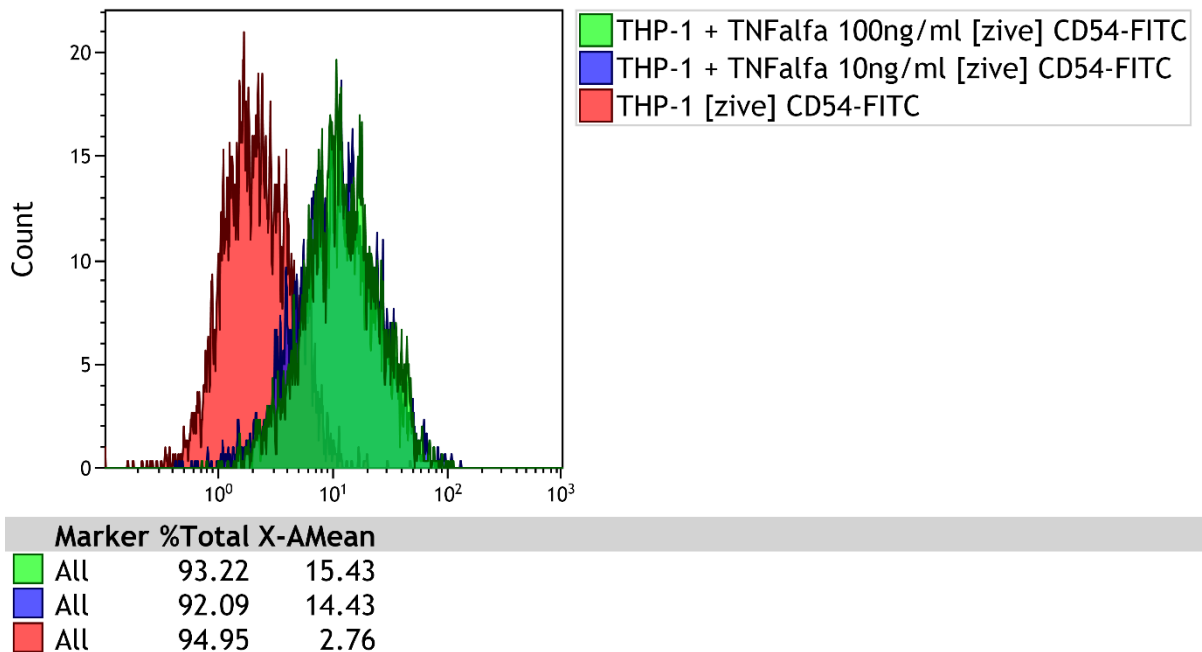
IFN γ – povrchový znak HLA-DR



Obr. č. 32

THP-1 buňky stimulovány IFN γ – povrchový znak HLA-DR

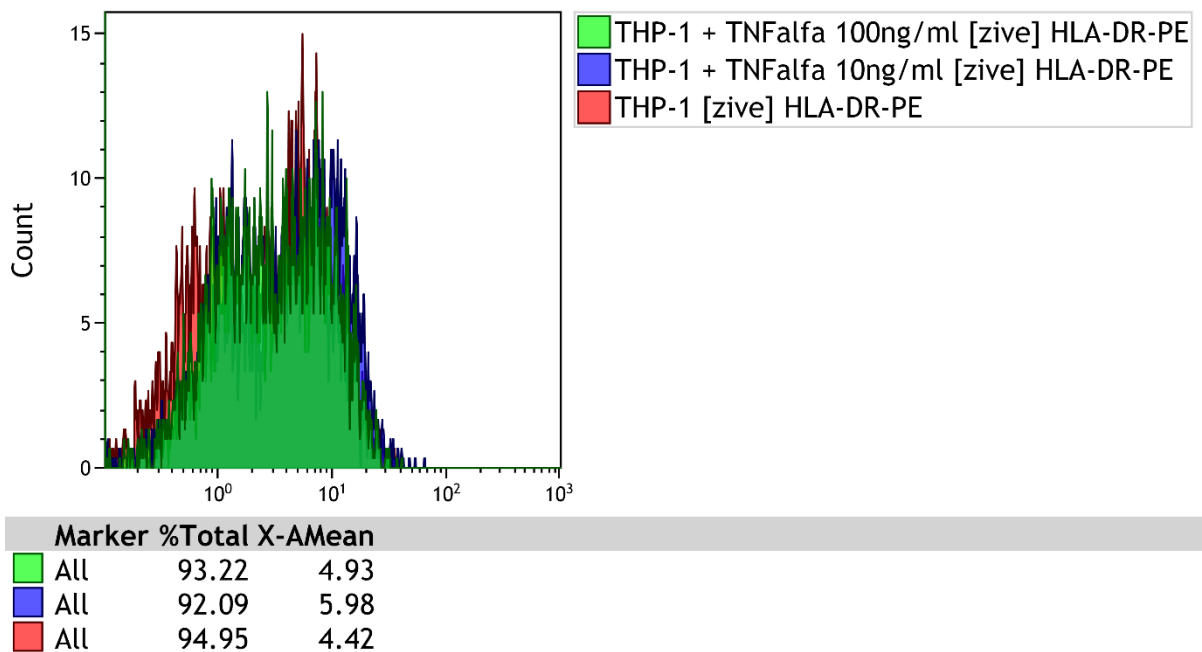
TNF α – povrchový znak CD54



Obr. č. 33

THP-1 buňky stimulovány TNF α – povrchový znak CD54

TNF α – povrchový znak HLA-DR

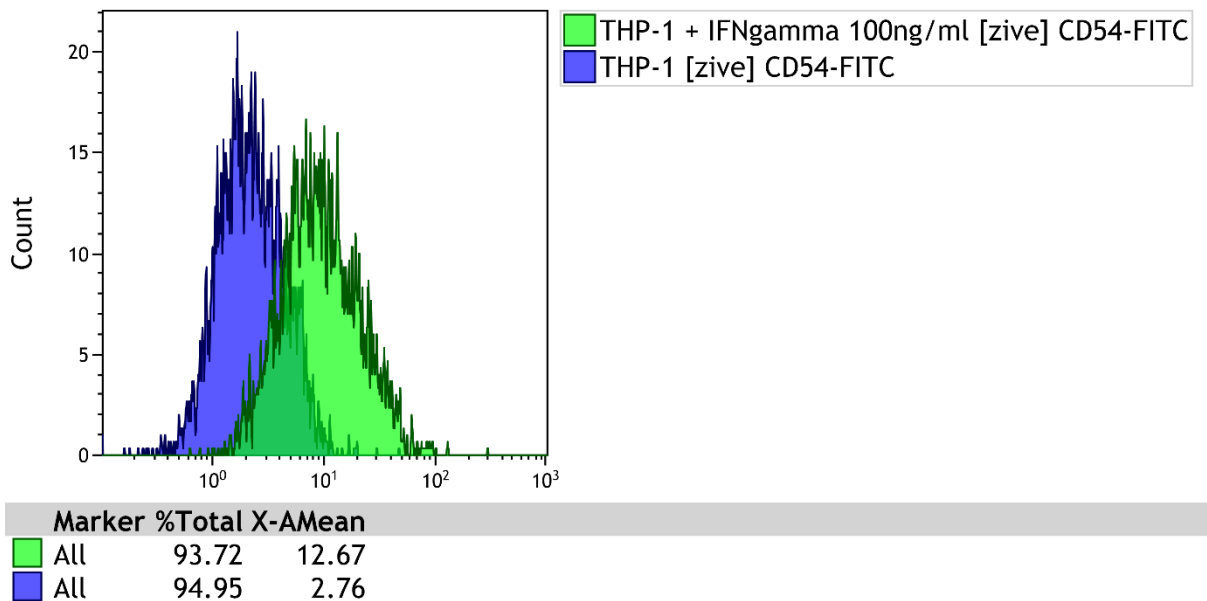


Obr. č. 34

THP-1 buňky stimulovány TNF α – povrchový znak HLA-DR

Vybrané stimuly pro další práci

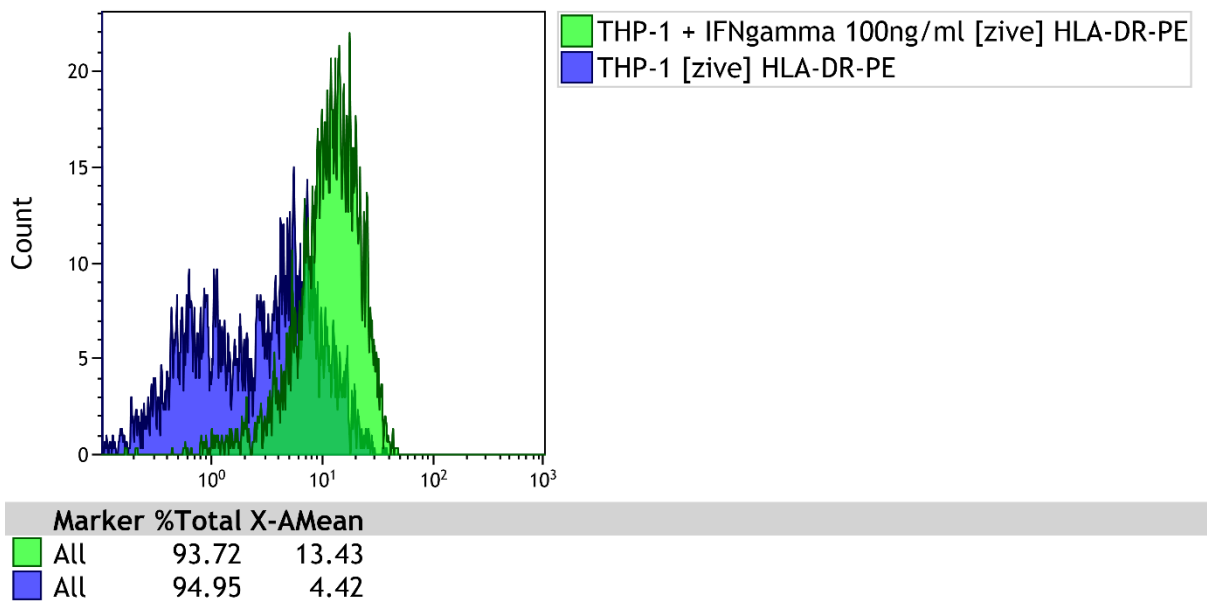
IFN γ 100ng/ml – povrchový znak CD54



Obr. č. 35

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml – povrchový znak CD54
IFN γ velmi dobře indukuje expresi povrchového znaku CD54 u THP-1 buněk.

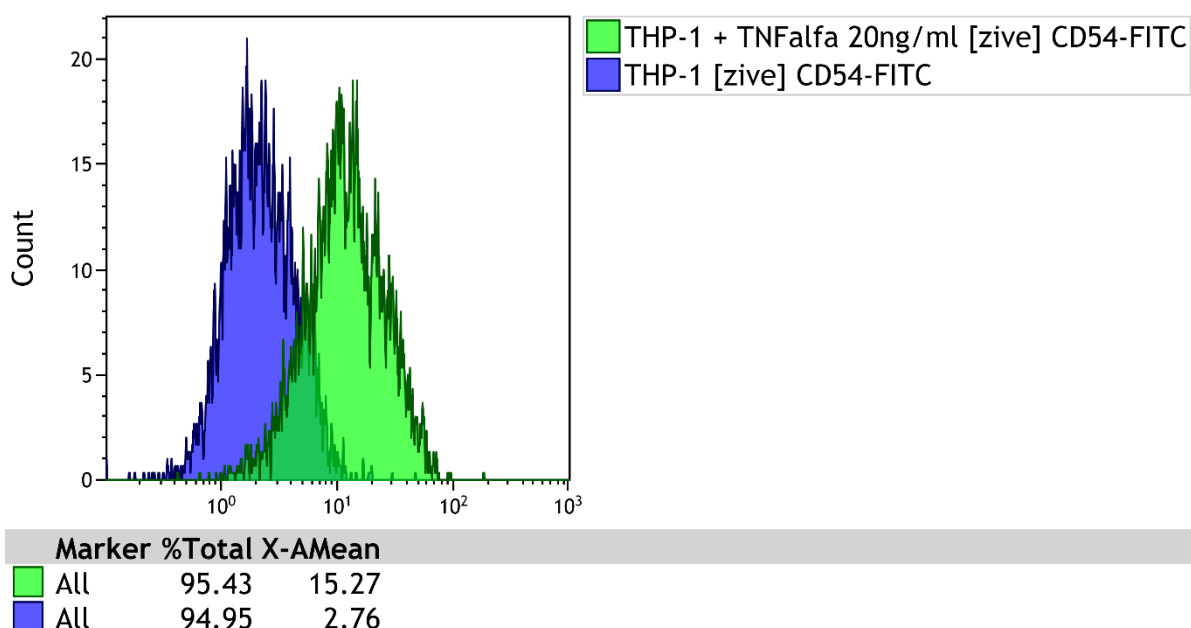
IFN γ 100ng/ml – povrchový znak HLA-DR



Obr. č. 35

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml – povrchový znak HLA-DR
THP-1 buňky jsou rozděleny na buňky negativní na HLA-DR a pozitivní na HLA-DR. Po stimulaci IFN γ je HLA-DR exprimován na většině buněk.

TNF α 20ng/ml – povrchový znak CD54

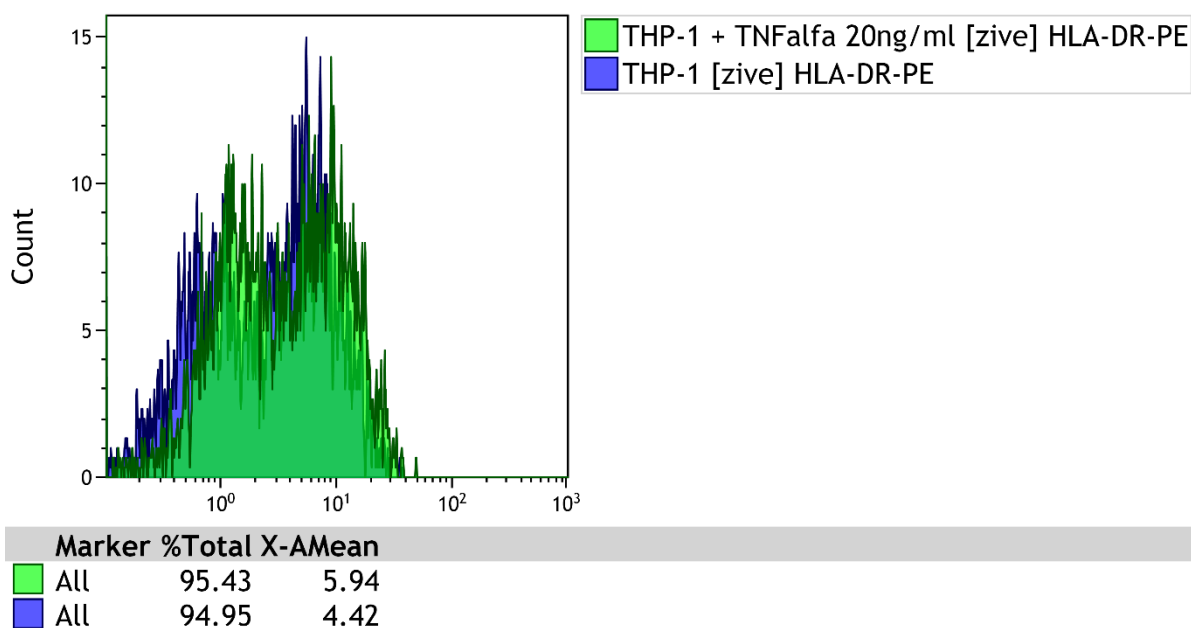


Obr. č. 37

THP-1 buňky stimulovány TNF α 20ng/ml – povrchový znak CD54

TNF α velmi dobře indukuje expresi povrchového znaku CD54 u THP-1 buněk. Byla vybrána koncentrace 20ng/ml. Vyšší koncentrace měli na buňky již cytotoxické efekt.

TNF α 20ng/ml – povrchový znak HLA-DR



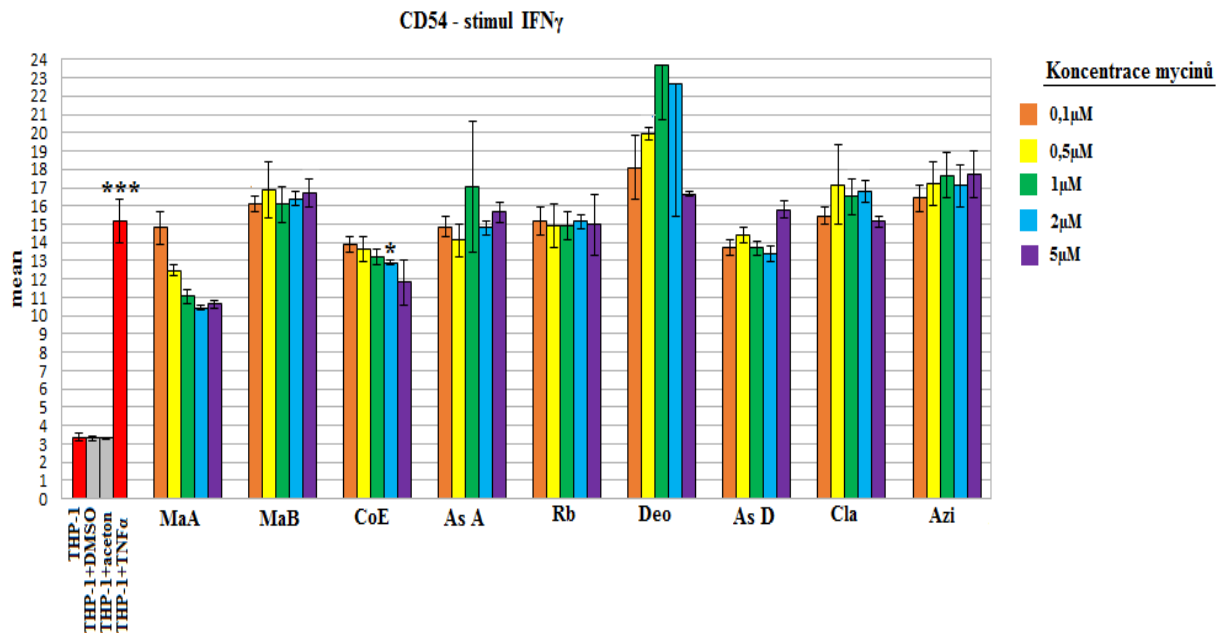
Obr. č. 38

THP-1 buňky stimulovány TNF α 20ng/ml – povrchový znak HLA-DR

Podle výsledků TNF α buňky k expresi HLA-DR stimuloval minimálně, však v odborných člancích se uvádí opak. Proto byl tento povrchový znak pozorován i v dalších pokusech.

5.4 Měření exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách

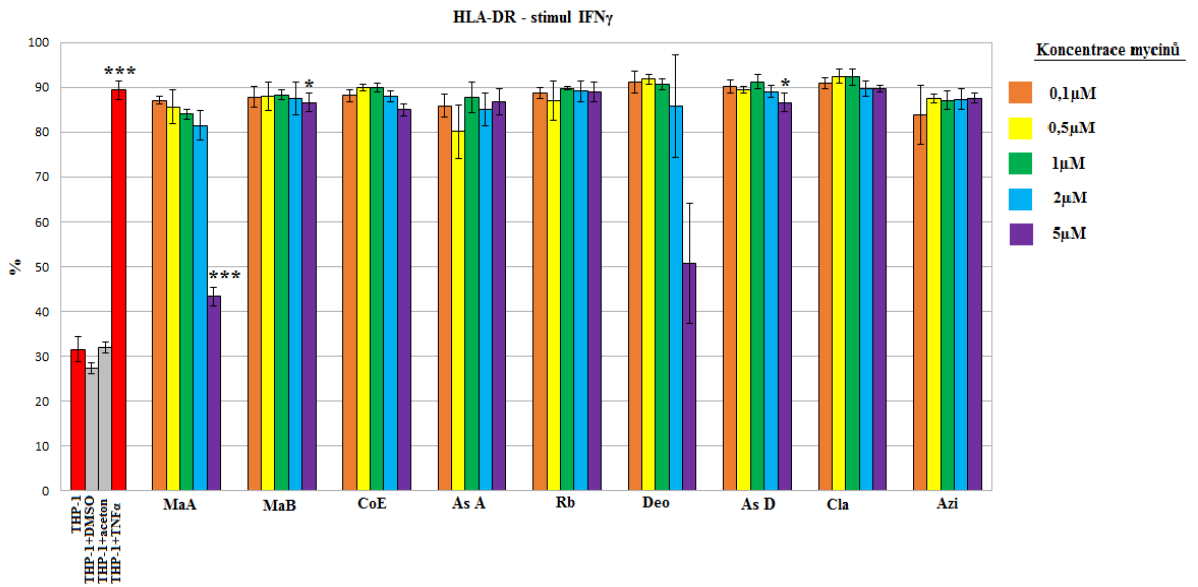
THP-1 buňky byly inkubovány s vybranými stimuly a testovanými myciny. Bylo sledováno, zda dojde vlivem mycinů ke změně exprese povrchových znaků na THP-1 buňkách. Jako stimul byl použit IFN γ 20ng/ml a TNF α 100ng/ml. U CD54 se měřil pouze mean jelikož všechny buňky tvořili pouze jednu pozitivní populaci na CD54. U HLA-DR se měřil mean, a také kolik procent buněk je pozitivní na HLA-DR. Stimulované buňky byly porovnávány s buňkami nestimulovanými. Inhibiční účinek mycinů byl porovnán vůči buňkám, které byly inkubovány pouze se stimulem.



Obr. č. 39

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml – povrchový znak CD54

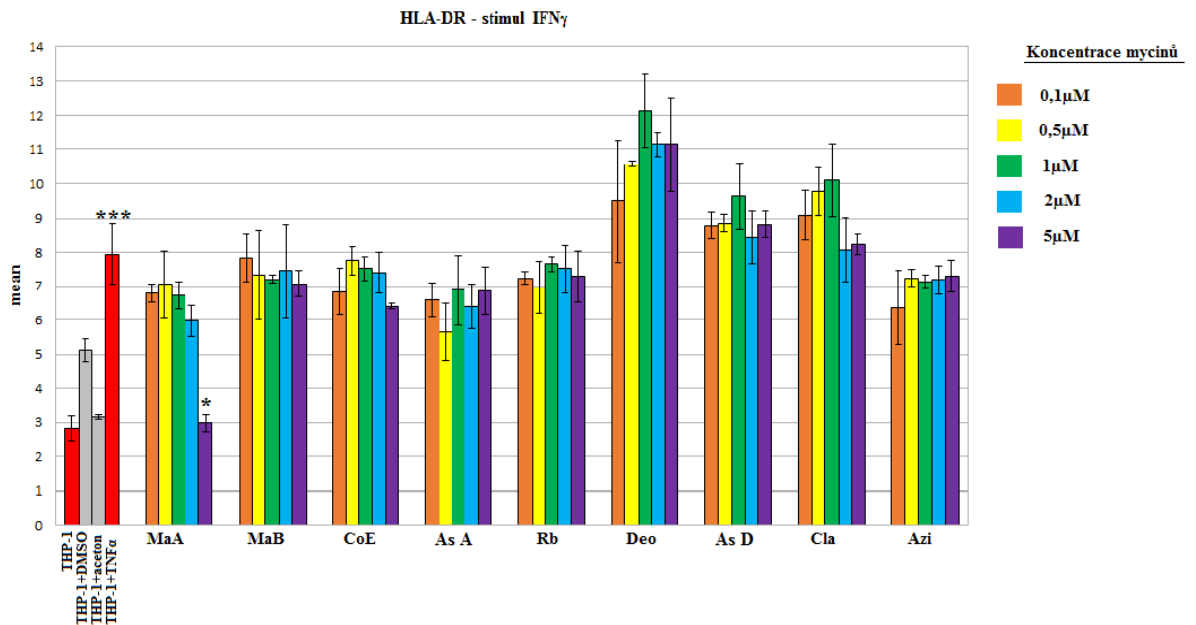
Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$.



Obr. č. 40

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml – povrchový znak HLA-DR (%)

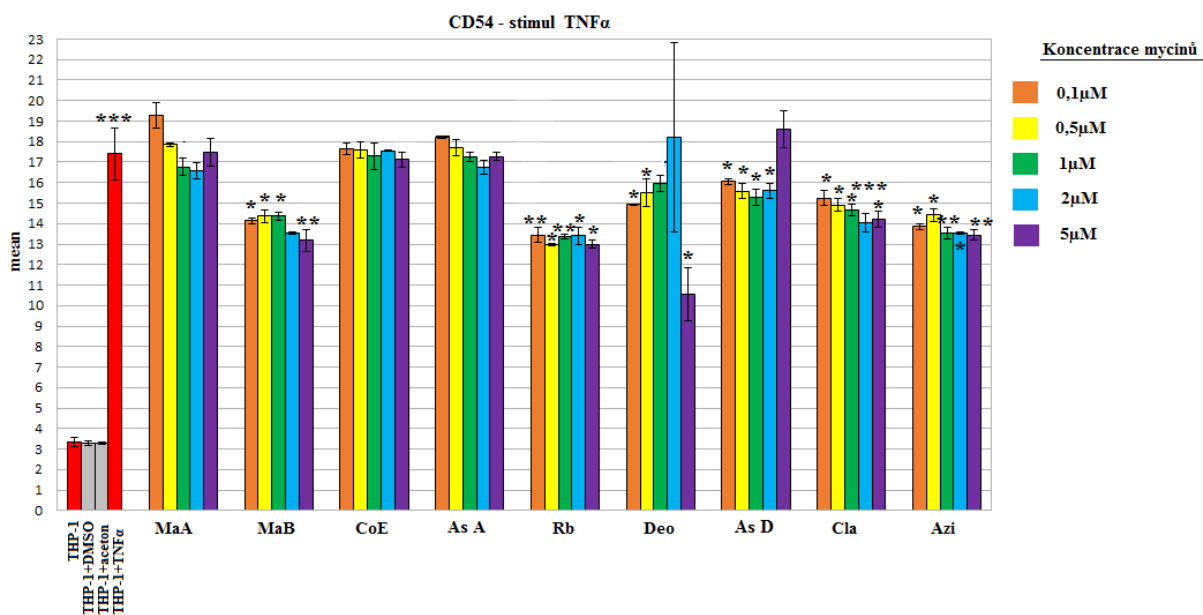
Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.



Obr. č. 41

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml – povrchový znak HLA-DR (mean)

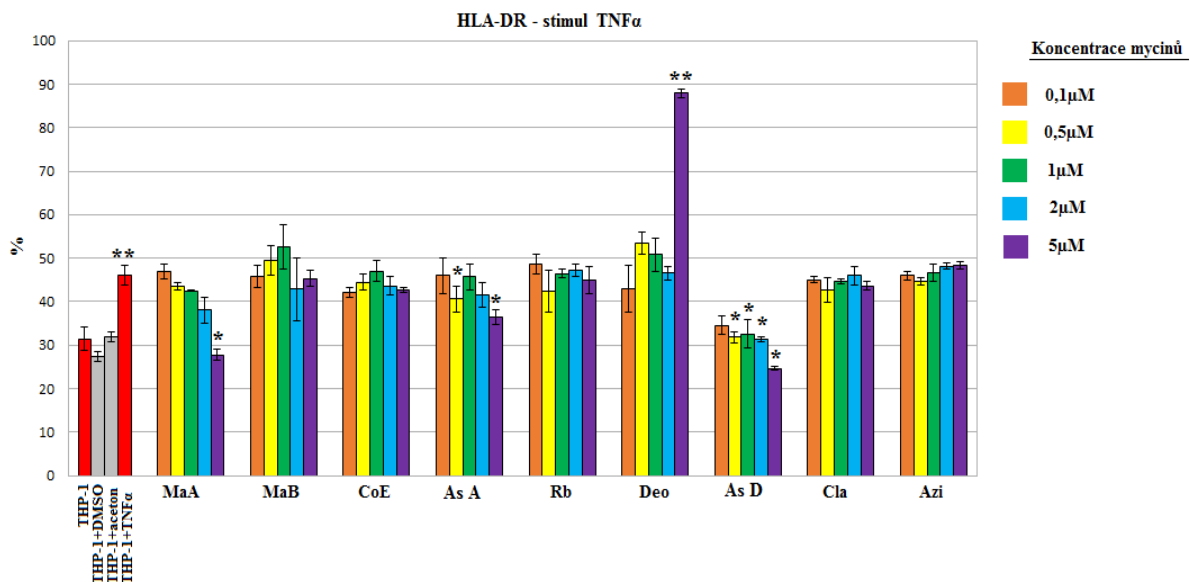
Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$.



Obr. č. 42

THP-1 buňky stimulovány TNF α 20ng/ml – povrchový znak CD54

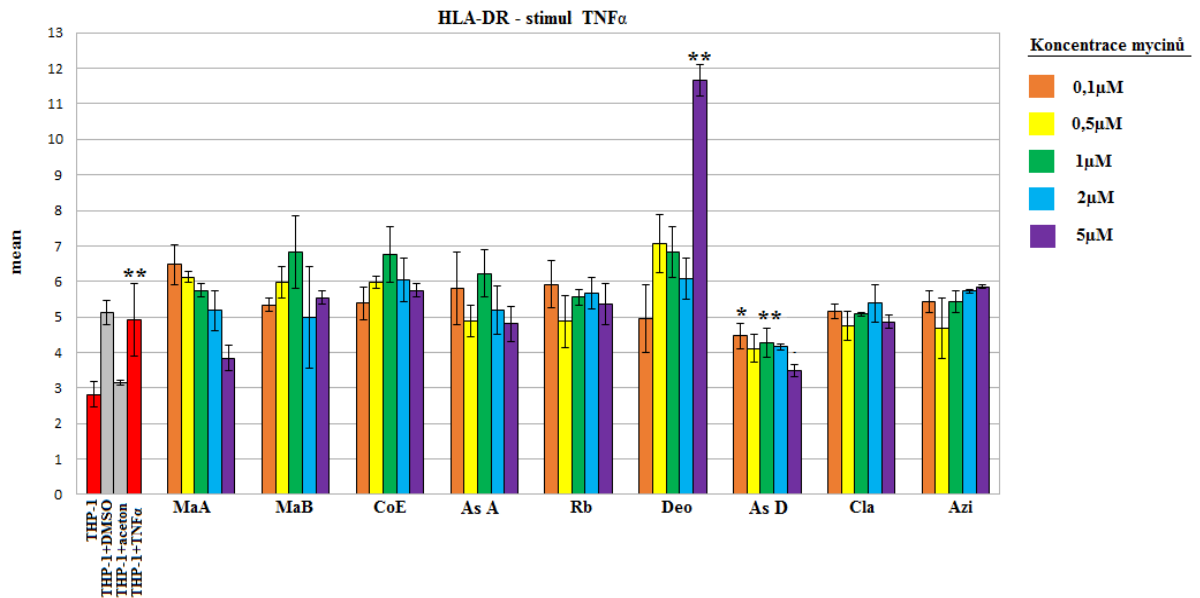
Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Obr. č. 43

THP-1 buňky stimulovány TNF α 20ng/ml – povrchový znak HLA-DR (%)

Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.



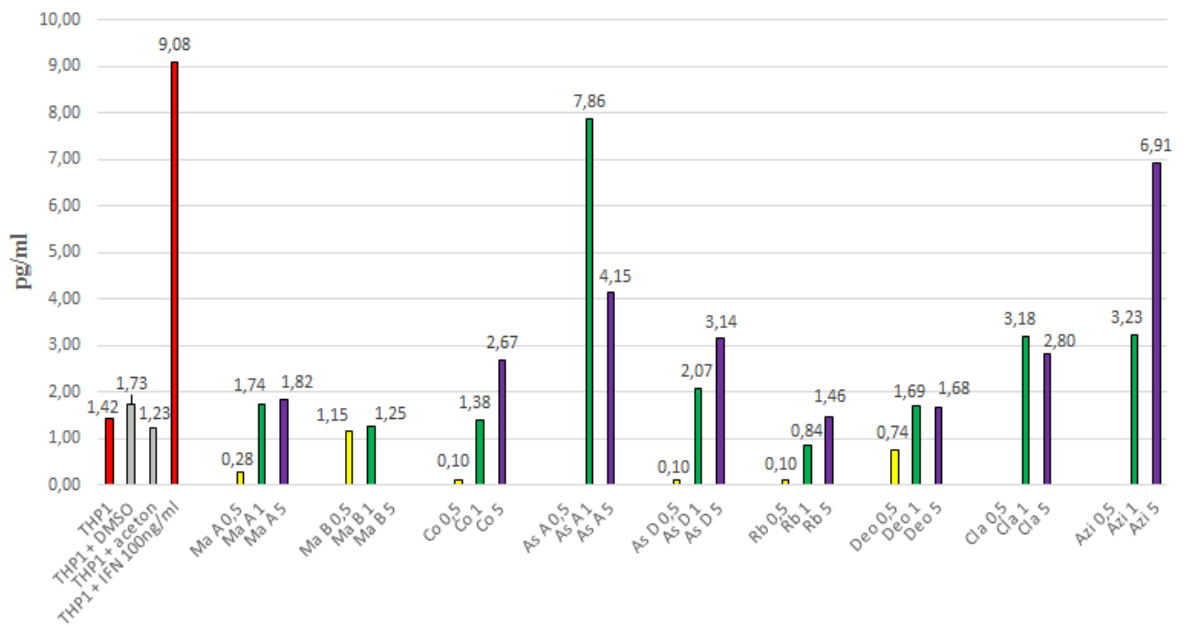
Obr. č. 44

THP-1 buňky stimulovány TNF α 20ng/ml – povrchový znak HLA-DR (mean)
 Symbol * určuje hladinu významnosti $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

5.5 Stanovení koncentrace cytokinů a chemokinů

Zde bylo sledováno, zda myciny inhibují produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů u stimulovaných buněk. U této metody došlo během práce k technickým potížím a některé vzorky byly znehodnoceny. Proto zde nemohla být vypočítána směrodatná odchylka ani statistická významnost. Tyto výsledky je nutné brát jen za orientační. Buňky byly stimulovány IFN γ 100ng/ml a TNF α 20ng/ml. Koncentrace cytokinů a chemokinů se měřila za použití 0,5; 1; 5 μ M myciny. U stimulu IFN γ byla měřena koncentrace IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , RANTES a u stimulu TNF α byla měřena koncentrace IL-1 β , IL-6.

IL-1 β - stimul IFN γ

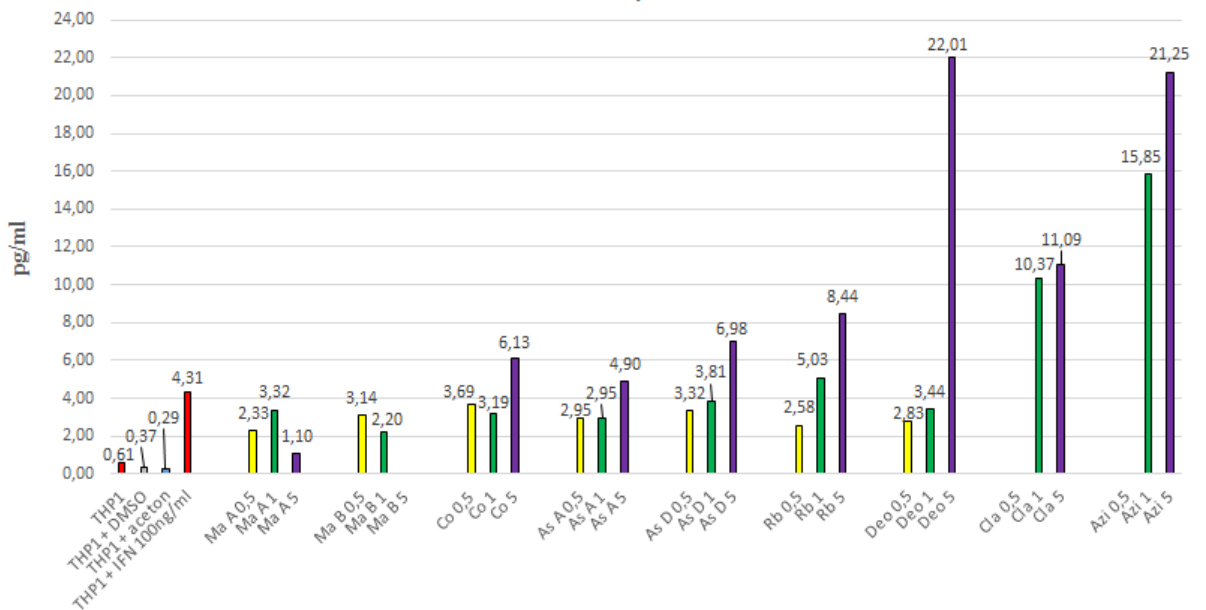


Obr. č. 45

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml

Ztráta dat: As A 0,5 μ M; Cla 0,5 μ M; Azi 0,5 μ M

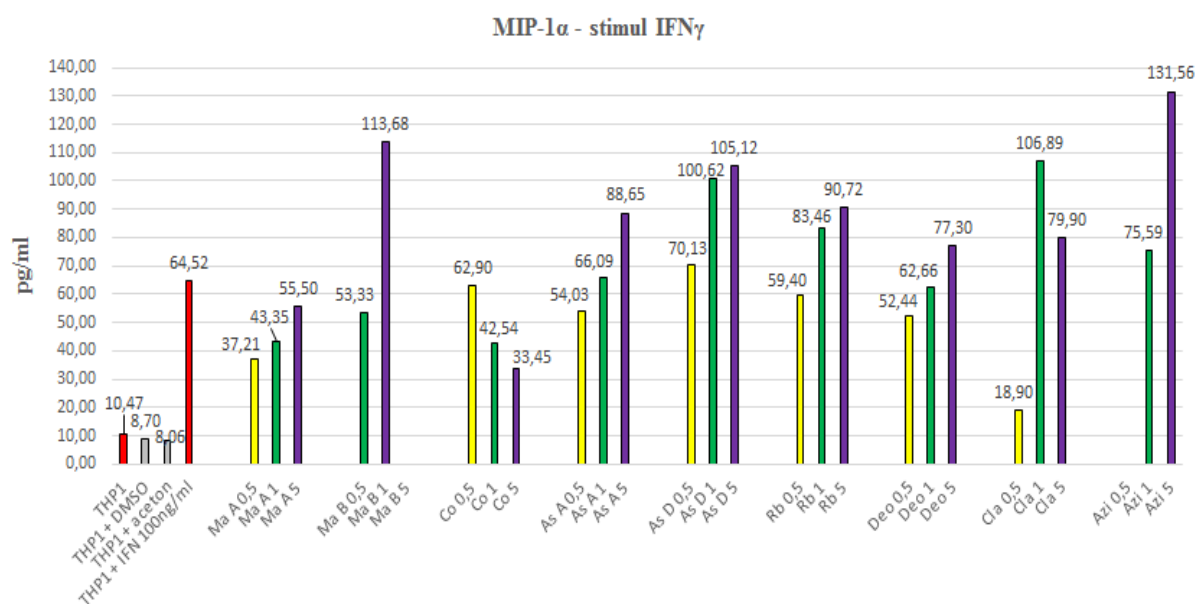
IL-6 - stimul IFN γ



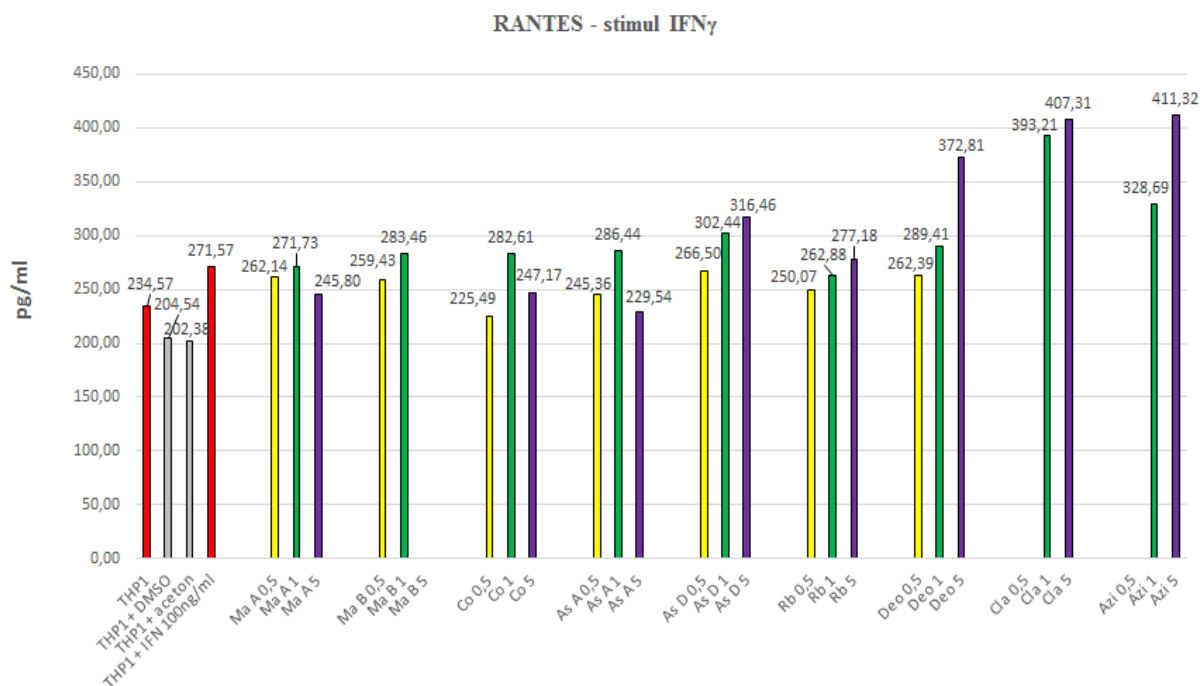
Obr. č. 46

THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml

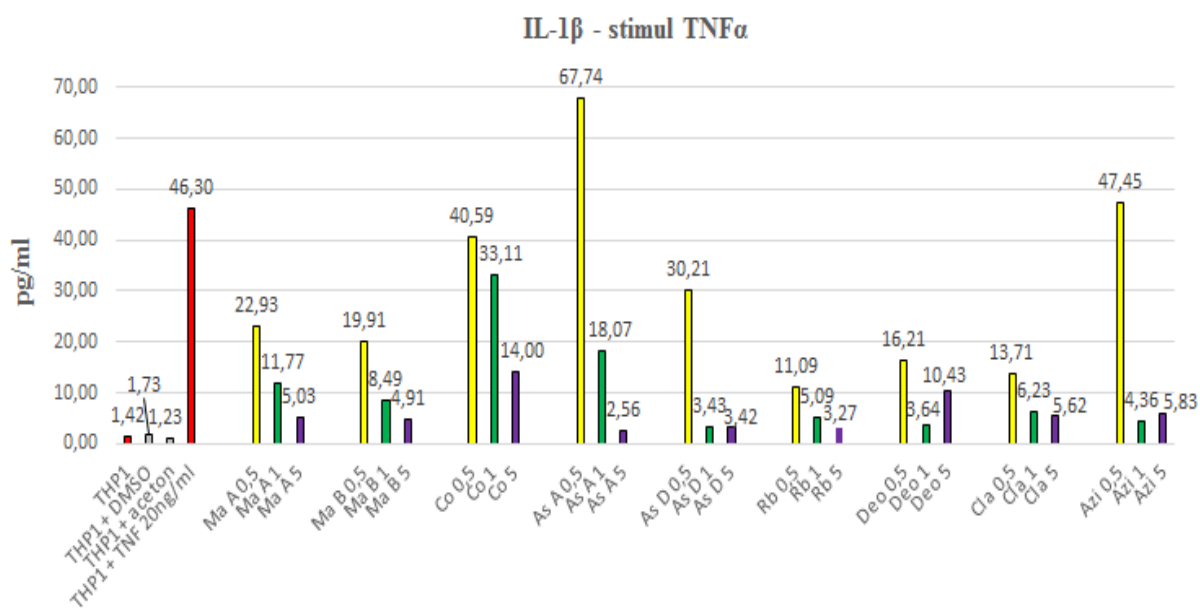
Ztráta dat: Ma B 5 μ M; Cla 0,5 μ M; Azi 0,5 μ M



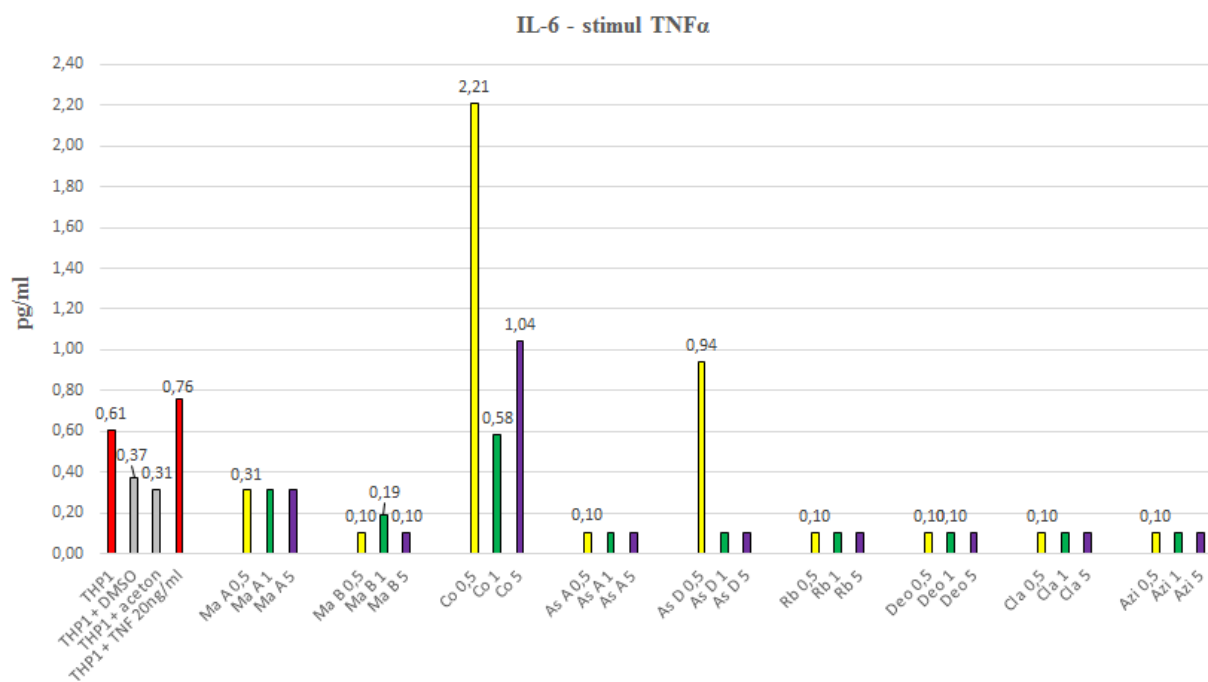
Obr. č. 48
 THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml
 Ztráta dat: Ma B 5 μ M; Azi 0,5 μ M



Obr. č. 49
 THP-1 buňky stimulovány IFN γ 100ng/ml
 Ztráta dat: Ma B 5 μ M; Cla 0,5 μ M; Azi 0,5 μ M



Obr. č. 50
THP-1 buňky stimulovány TNF 20ng/ml



Obr. č. 50
THP-1 buňky stimulovány TNF 20ng/ml

5.6 Stanovení proliferace THP-1 buněk

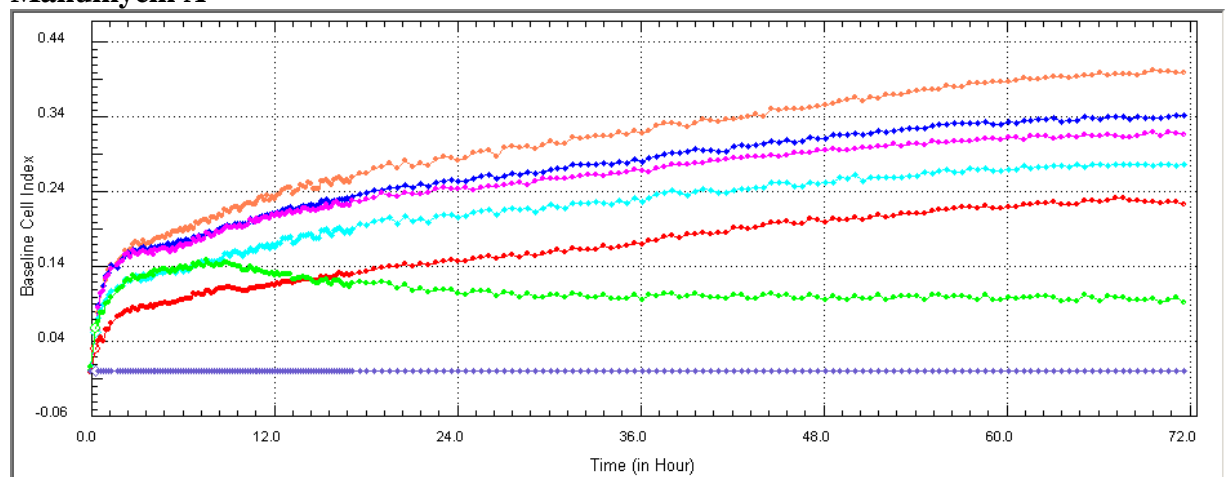
Bylo sledováno, zda mají testované myciny vliv na proliferaci THP-1 buněk. Byly měřeny buňky bez stimulu a stimulované buňky IFN γ 100ng/ml, TNF α 20ng/ml. Myciny byly testovány v koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μ M.

Legenda:

- medium
- THP-1
- THP-1 + stimul
- 0,1 μ M
- 0,5 μ M
- 1 μ M
- 2 μ M
- 5 μ M

THP-1 buňky bez stimulu

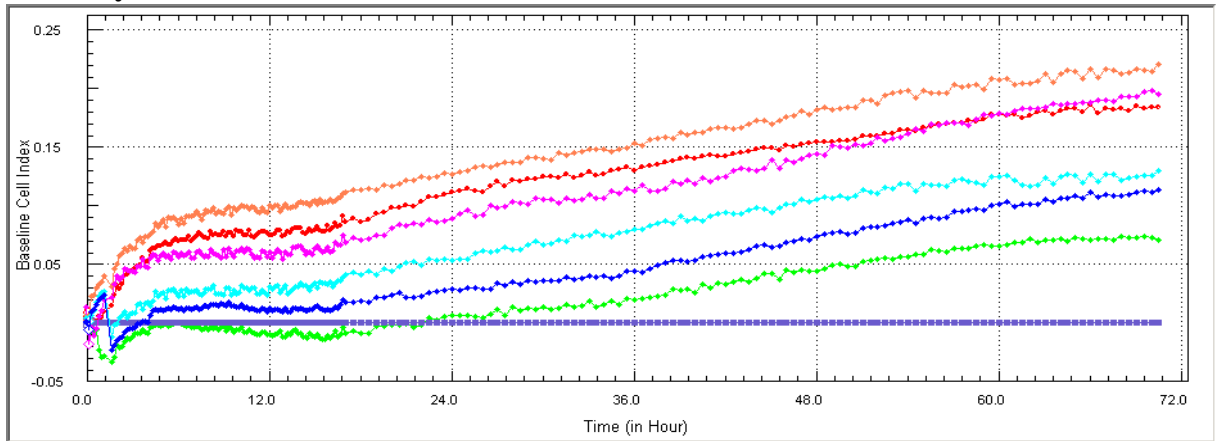
Manumycin A



Obr. č. 52

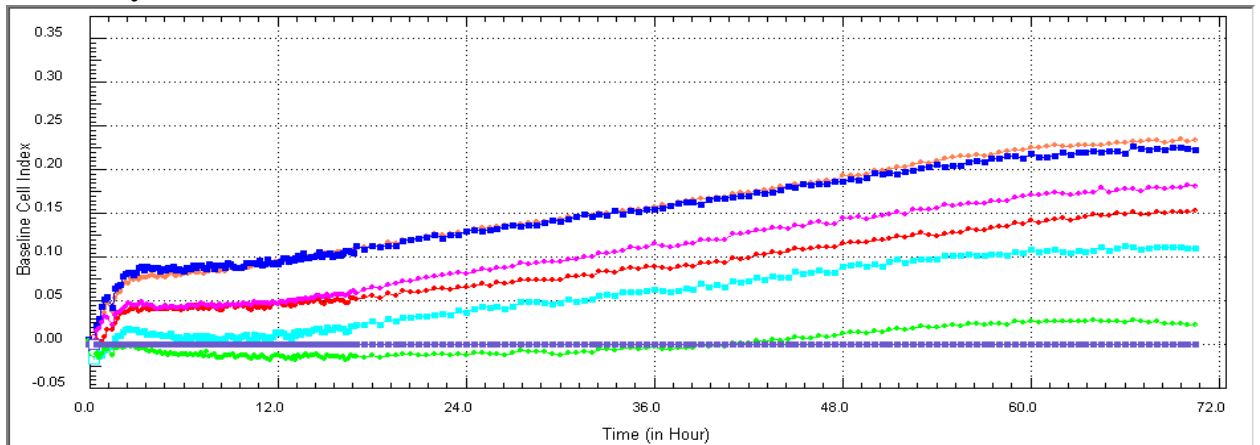
THP-1 buňky byly inkubovány s manumycinem A

Manumycin B



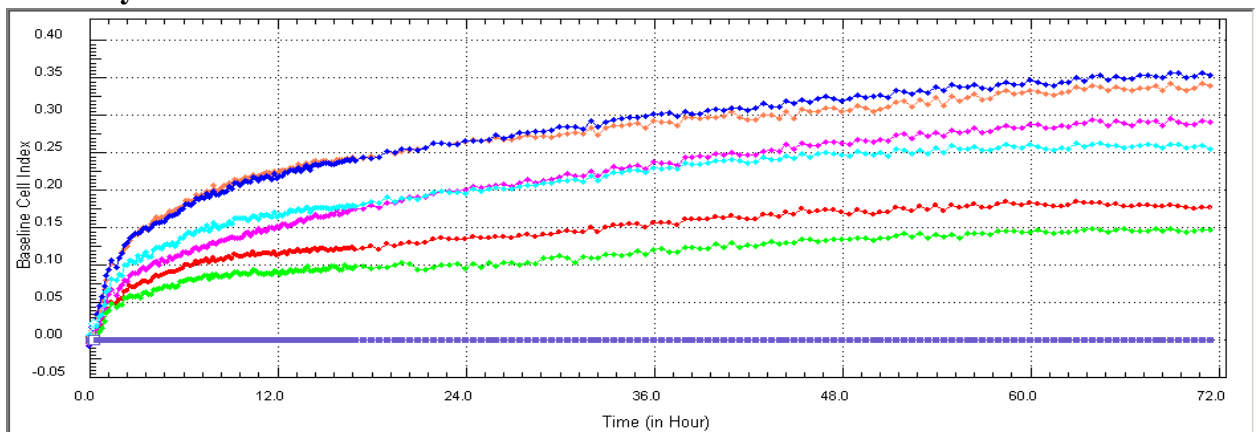
Obr. č. 53
THP-1 buňky byly inkubovány s manumycinem B

Colabomycin E



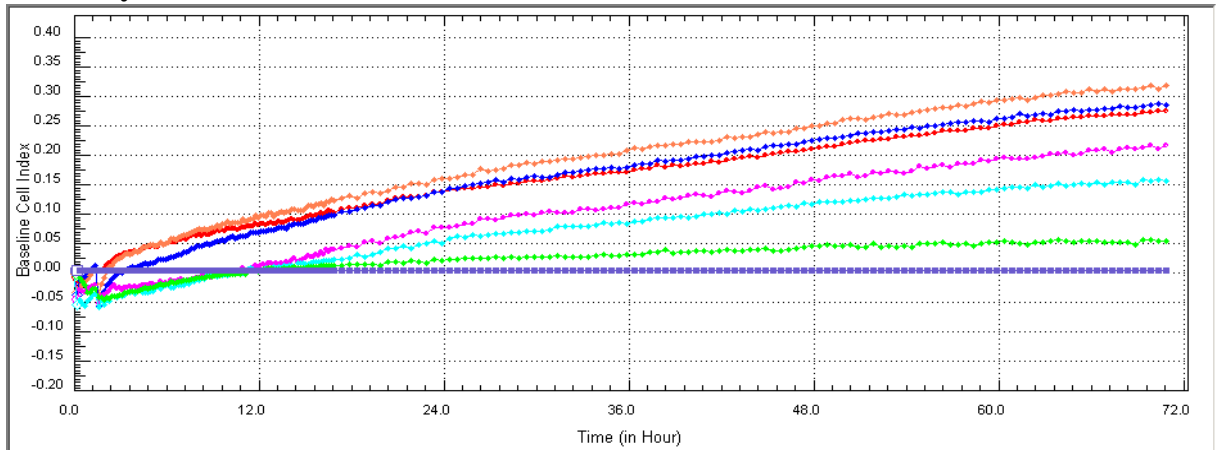
Obr. č. 54
THP-1 buňky byly inkubovány s colabomycinem E

Asukamycin A



Obr. č. 55
THP-1 buňky byly inkubovány s asukamycinem A

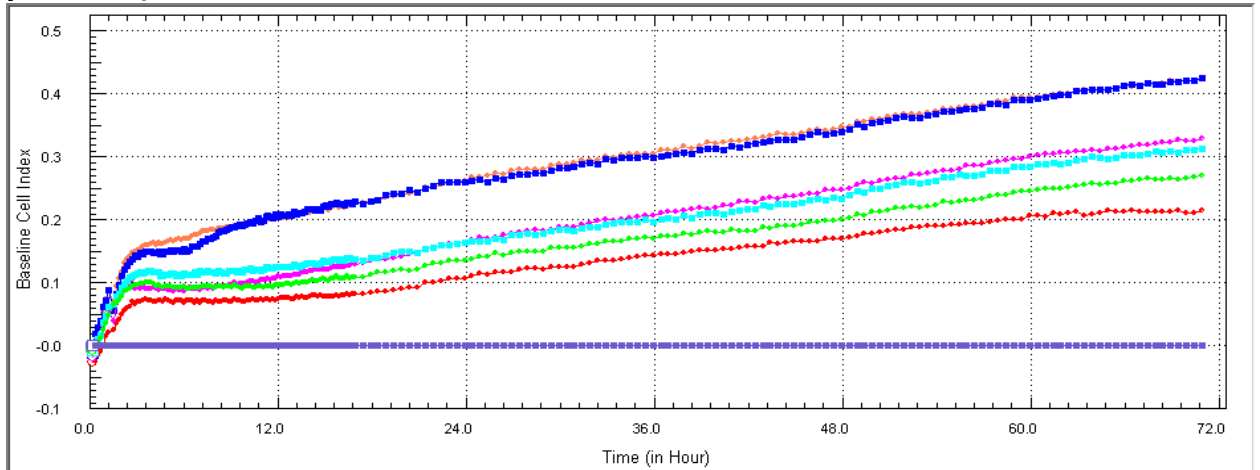
Asukamycin D



Obr. č. 56

THP-1 buňky byly inkubovány s asukamycinem D

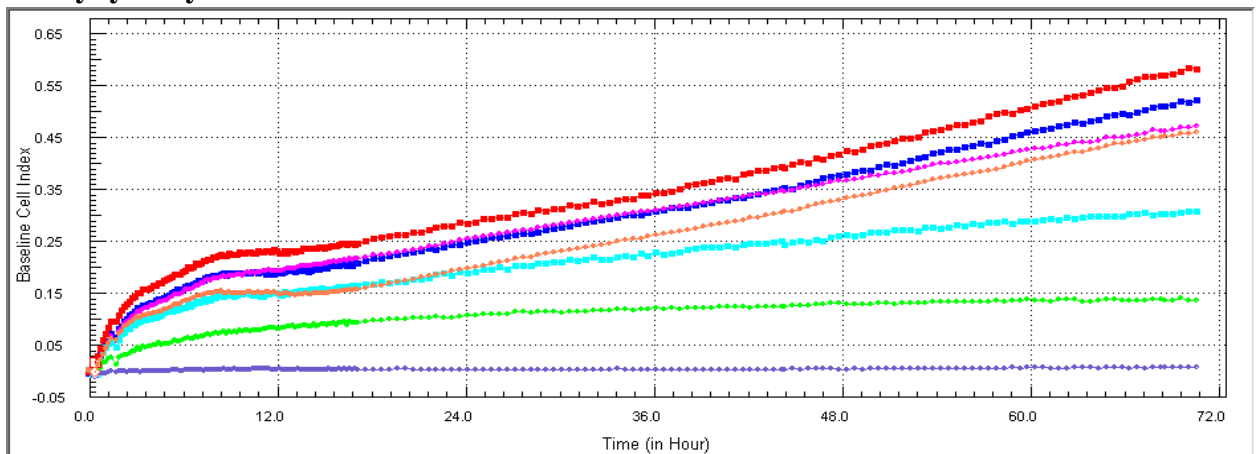
β -rubromycin



Obr. č. 57

THP-1 buňky byly inkubovány s β -rubromycinem

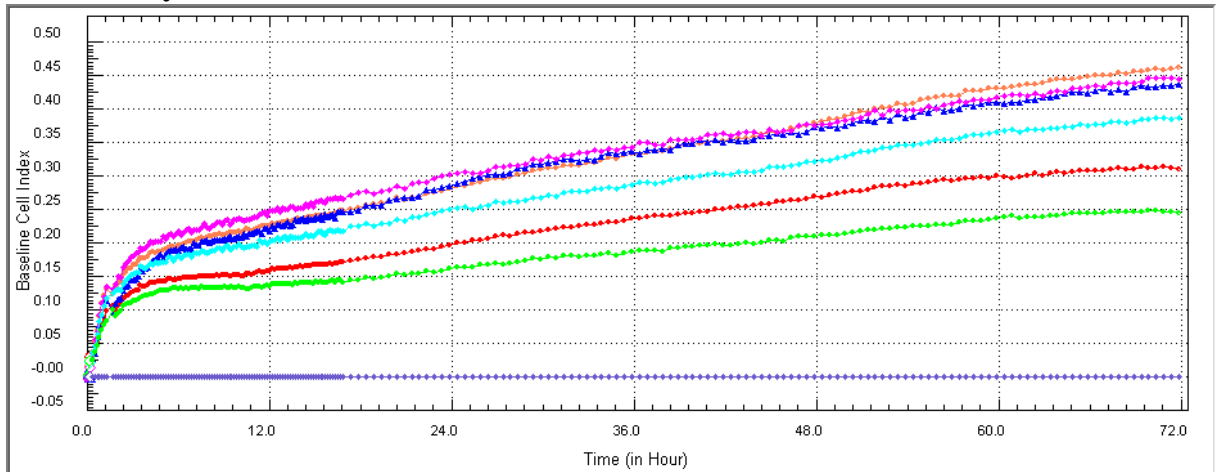
Deoxybomycin



Obr. č. 58

THP-1 buňky byly inkubovány s deoxybomycinem

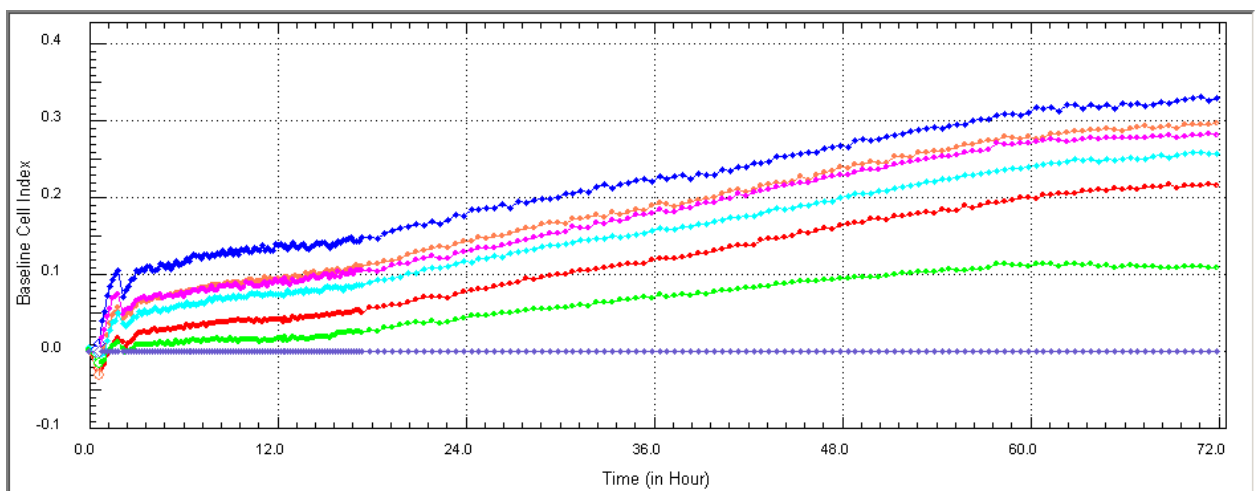
Clarithromycin



Obr. č. 59

THP-1 buňky byly inkubovány s clarithromycinem

Azithromycin dihydrate

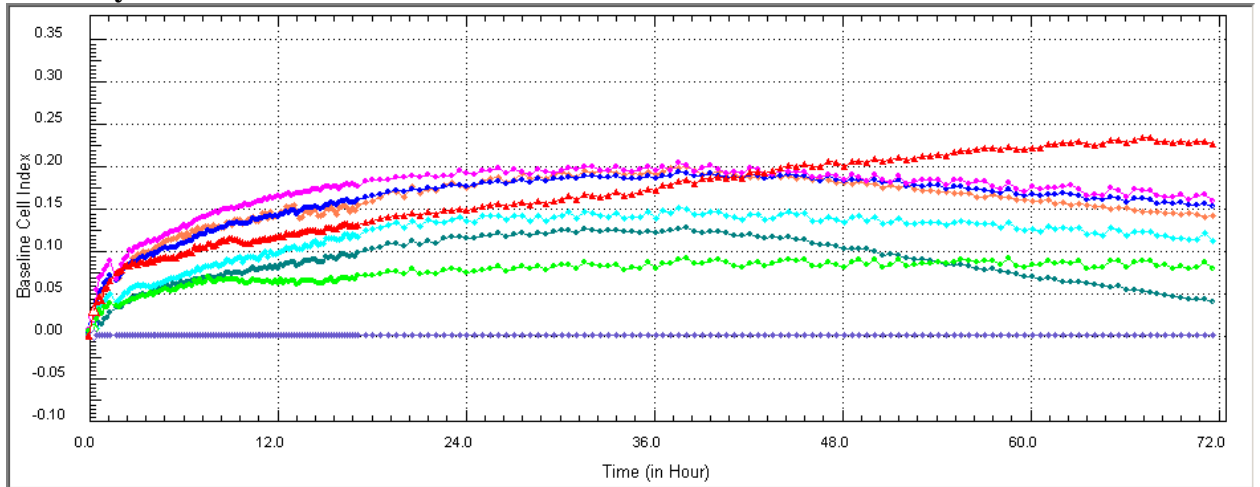


Obr. č. 60

THP-1 buňky byly inkubovány s azithromycinem dihydrate

THP-1 buňky stimulované IFN γ 100ng/ml

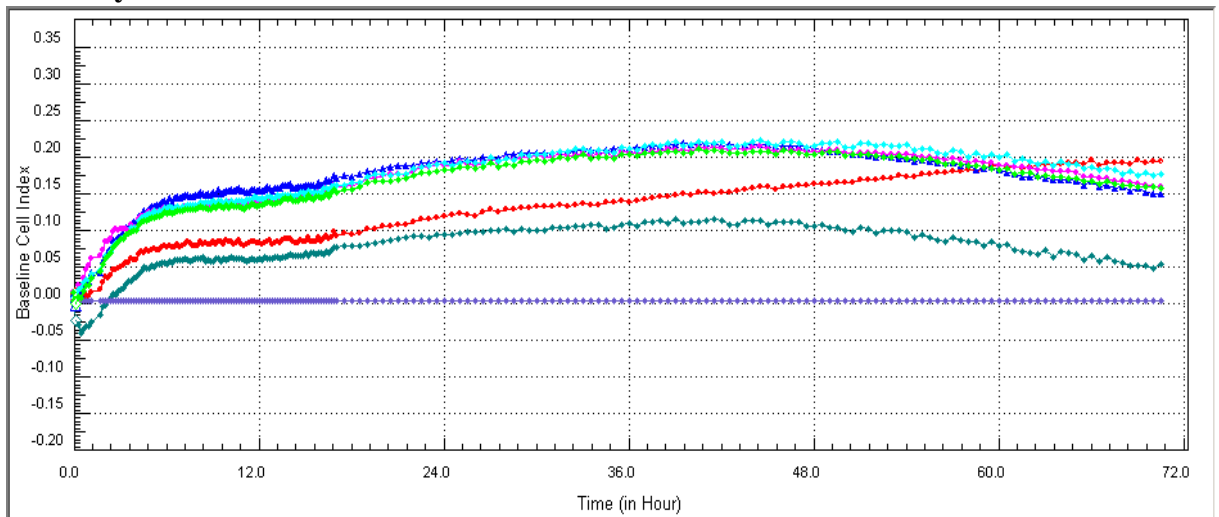
Manumycin A



Obr. č. 61

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a manumycinem A

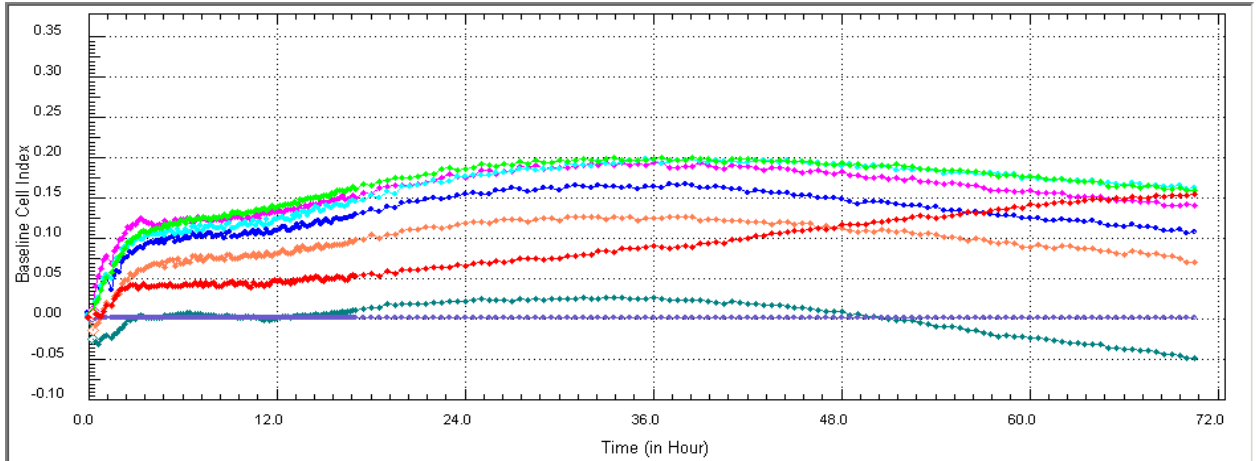
Manumycin B



Obr. č. 62

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a manumycinem B

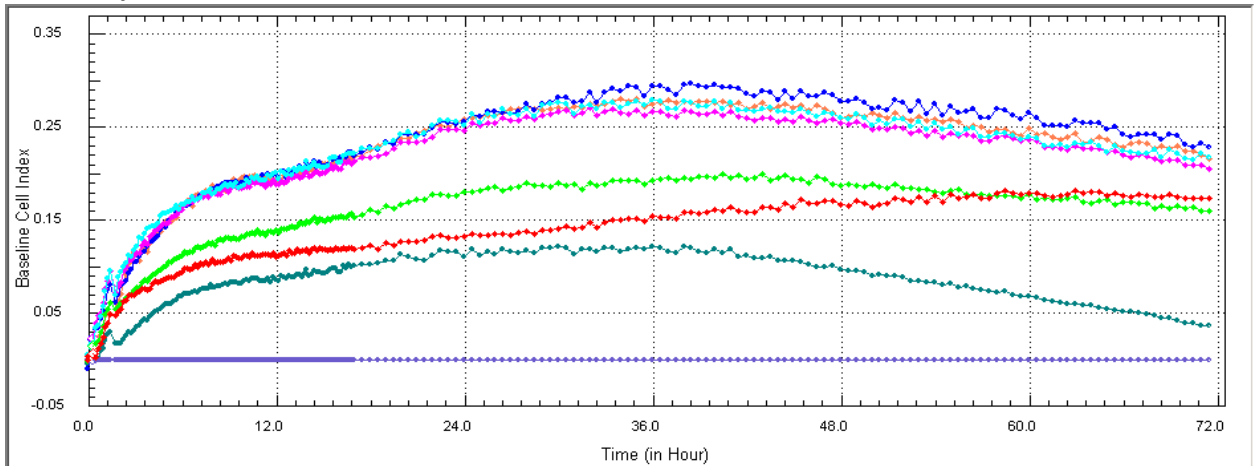
Colabomycin E



Obr. č. 63

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a colabomycinem E

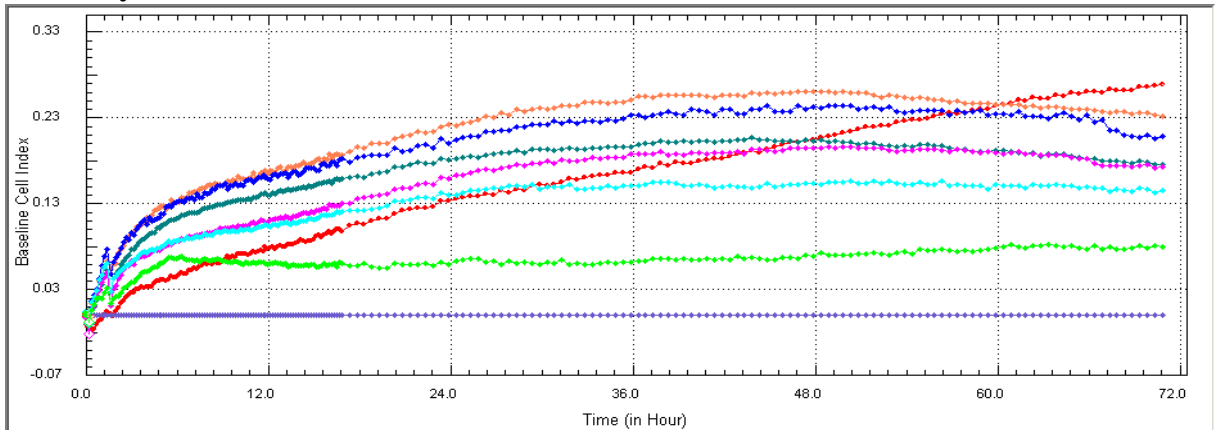
Asukamycin A



Obr. č. 64

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a asukamycinem A

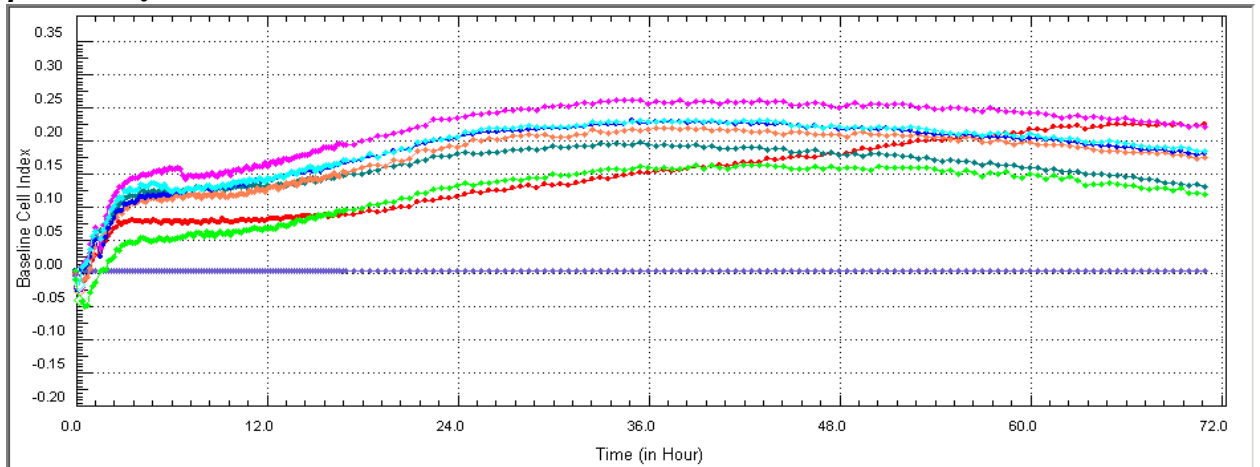
Asukamycin D



Obr. č. 65

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a asukamycinem D

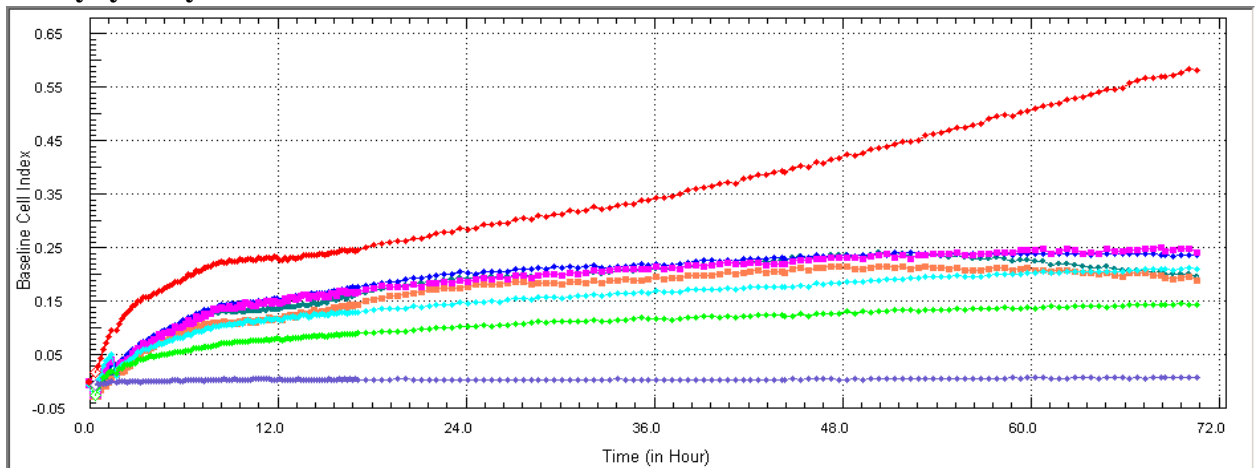
β -rubromycin



Obr. č. 66

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a β -rubromycinem

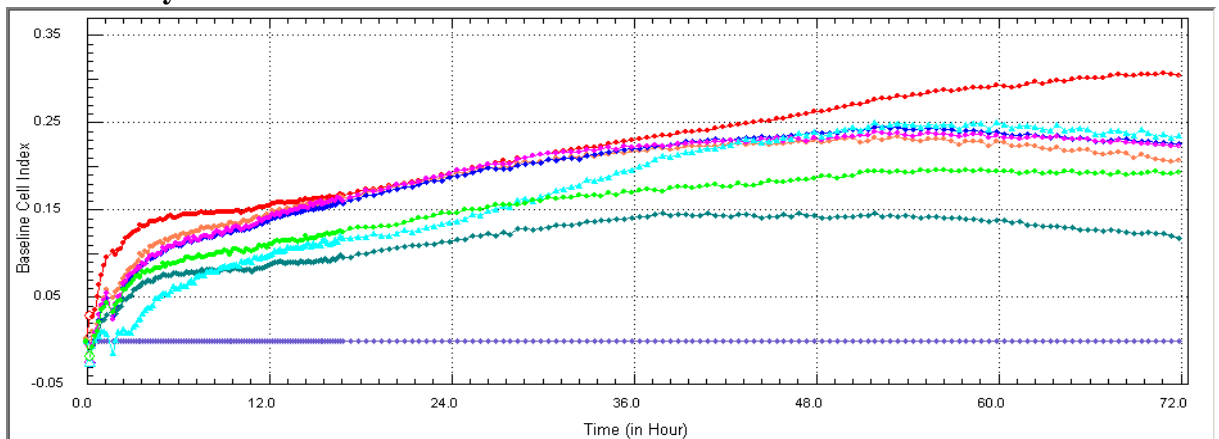
Deoxynybomycin



Obr. č. 67

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a deoxynybomycinem

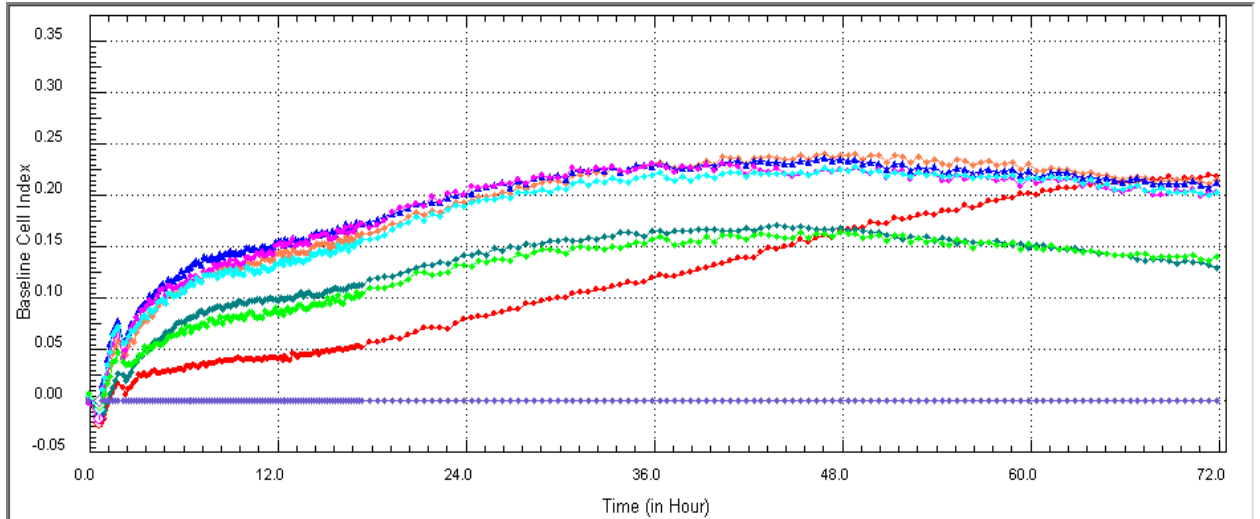
Clarithromycin



Obr. č. 68

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml clarithromycinem

Azithromycin dihydrate

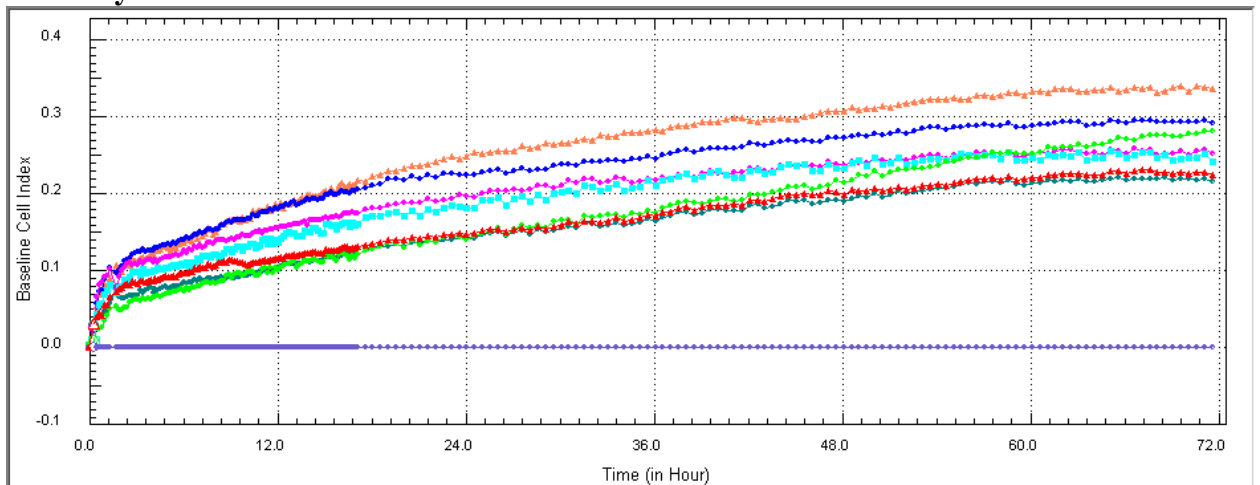


Obr. č. 69

THP-1 buňky byly inkubovány s IFN γ 100ng/ml a azithromycinem dihydrate

THP-1 buňky stimulované TNF α 20ng/ml

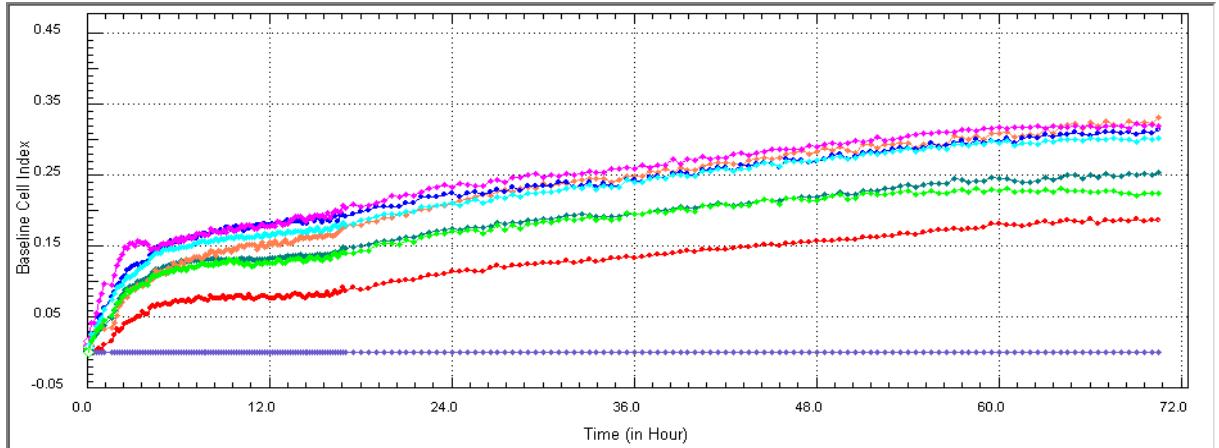
Manumycin A



Obr. č. 70

THP-1 buňky byly inkubovány s TNF α 20ng/ml a manumycinem A

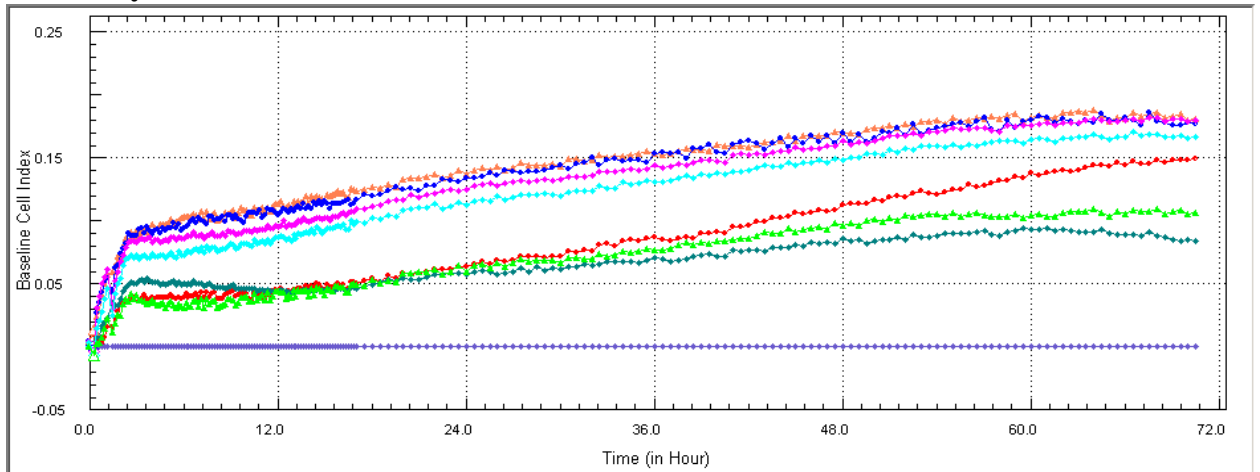
Manumycin B



Obr. č. 71

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a manumycinem B

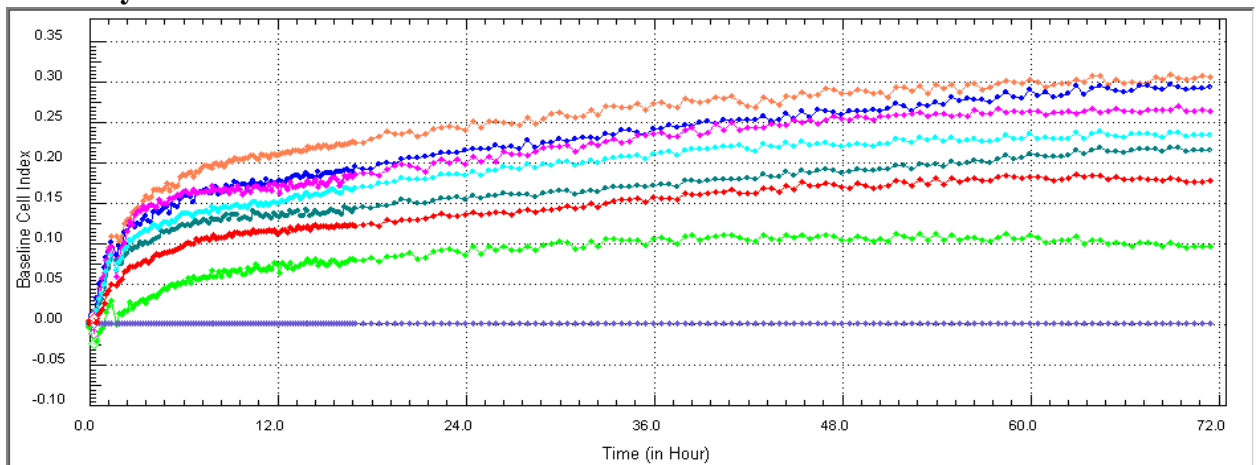
Colabomycin E



Obr. č. 72

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a colabomycinem E

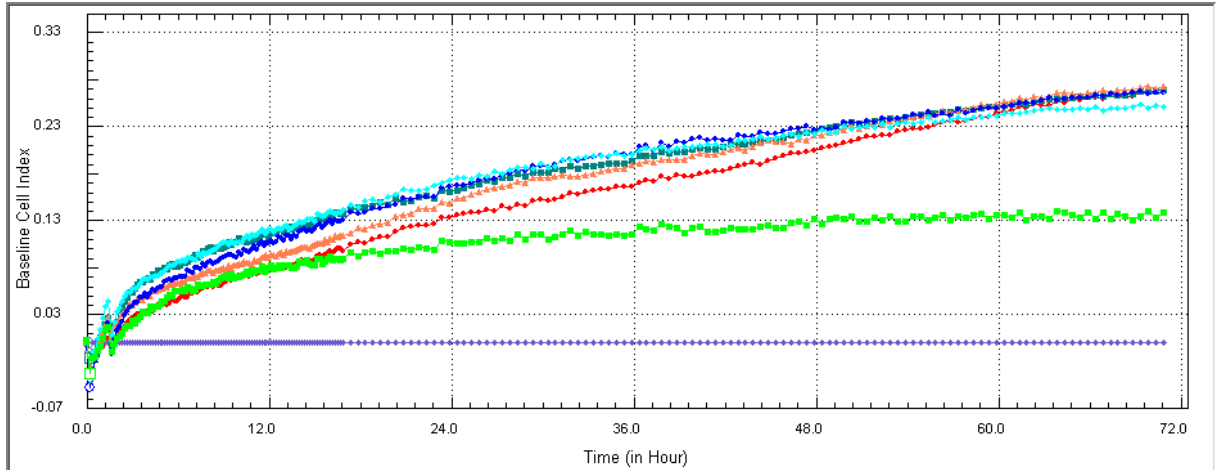
Asukamycin A



Obr. č. 73

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a asukamycinem A

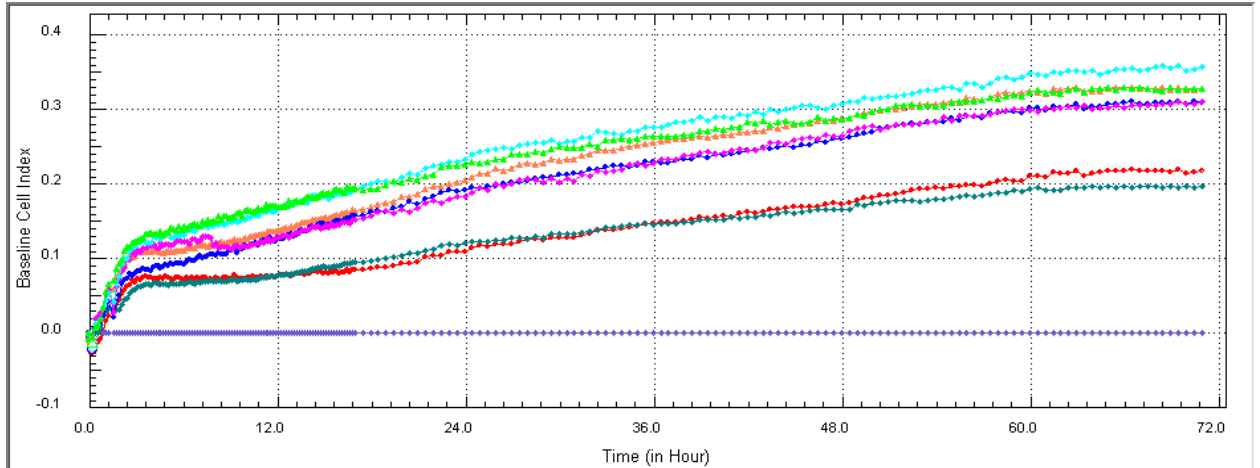
Asukamycin D



Obr. č. 74

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a asukamycinem D

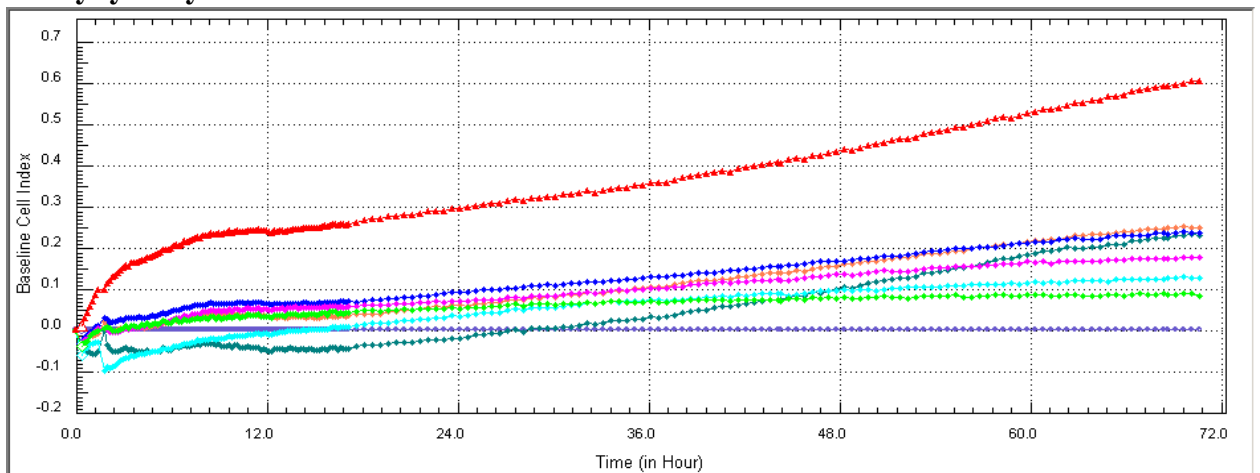
β -rubromycin



Obr. č. 75

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a β -rubromycinem

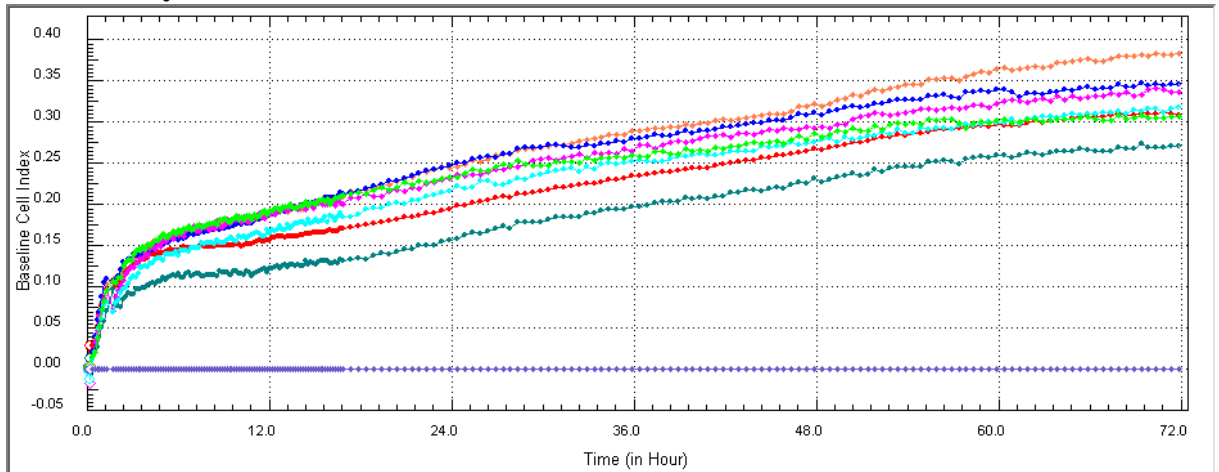
Deoxybomycin



Obr. č. 76

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a deoxybomycinem

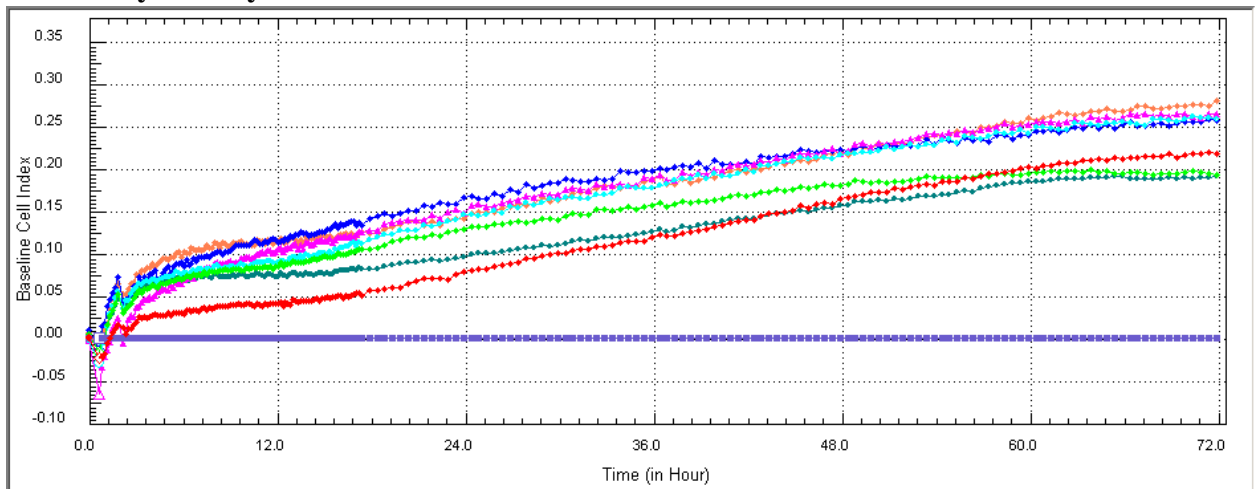
Clarithromycin



Obr. č. 77

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a clarithromycinem

Azithromycin dihydrate



Obr. č. 78

THP-1 buňky byly inkubovány s $\text{TNF}\alpha$ 20ng/ml a azithromycinem dihydrate

5.7 Stanovení genové exprese

Stanovení genové exprese mělo dát informaci, zda koncentrace prozánětlivých cytokinů a chemokinů koreluje s koncentrací mRNA pro dané cytokiny a chemokiny. Měření genové exprese v rámci své práce provedla Mgr. Eva Čečrdlová a výsledky byly se souhlasem použity i do této diplomové práce. Ke stimulaci buněk byl použit TNF α 20ng/ml. Genová exprese byla prozatím měřena jen u 0,5 μ M manumycinu A.

Tab. č. 1

Geny u, kterých 0,5 μ M manumycin A zvyšuje genovou expresi

	reg.	p-hodnota	reg.	p-hodnota
HMOX1	10,26	0	3,86	0,01
TNFRSF10A	3,53	0,03	1,35	0,24
IL1R1	3,25	0	2,09	0,02
TICAM2	2,1	0	1,2	0,47
NLRP12	2,09	0	1,38	0,29
IL8	1,33	0,01	1,5	0,23

po 4hodinách

po 8hodinách

Tab. č. 2

Geny u, kterých 0,5 μ M manumycin A snižuje genovou expresi

	reg.	p-hodnota	reg.	p-hodnota
IL6	-3,64	0	-1,4	0,21
IL1B	-2,09	0	-1	0,96
IL10	-2,01	0	-1,04	0,88

po 4hodinách

po 8hodinách

6 Diskuze

Prozánětlivé cytokiny jsou součástí zánětlivé reakce a uplatňují se nejen v obranných mechanismech, ale i při imunopatologických reakcích, kde dochází k poškození tkáně. K jejich potlačení se využívá zejména kortikoterapie, různá imunosupresiva a v posledních letech též biologická léčba. Uplatnit by se mohly také bioaktivní sekundární metabolity, které jsou produkovány různými mikroorganismy. Do této skupiny patří například makrolidová antibiotika, zdá se že, velký potenciál mají i nově objevené polyketidy. Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit jak polyketidy ovlivňují expresi vybraných povrchových znaků a koncentrace prozánětlivých cytokinů u stimulovaných buněk. Tyto výsledky byly následně potvrzeny na genové úrovni. Též se monitorovala buněčná proliferace za přítomnosti testovaných polyketidů. Všechny pokusy byly prováděny na THP-1 buněčné linii (nádorová monocytární linie). Zkoumány byly polyketidy: manumycin A, manumycin B, colabomycin E, asukamycin A, asukamycin D, β -rubromycin, deoxynybomycin. Jako kontrolní látky byla použita makrolidová antibiotika clarithromycin a azithromycin dihydrate. Myciny byly testovány v koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2 a 5 μ M. Před každým pokusem byla měřena životnost THP-1, která se pochybovala vždy v rozmezí 97% až 98%.

Jako první byla měřena životnost buněk po čtyřiaadvacetihodinové inkubaci s testovanými látkami. Ke snížení životaschopnosti THP-1 linie došlo jen u mycinů při koncentraci 5 μ M. Pro zjištění jak buňky umírají, se využilo testu, kdy dochází k navazování annexinu V a 7-AAD. Tímto bylo upřesněno, že u žádného s použitých mycinů nedochází k nekróze buněčné linie. Největší úmrtnost buněk byla u manumycinu A, kdy bylo 58,78% buněk živých, 21,56% v časně apoptóze a 19,50% v pozdní apoptóze. Tím se potvrdila studie, kde se uvádí, že manumycin A indukuje apoptózu (SHE *et al.* 2006). Deoxynybomycin snížil životnost buněk na 57,20% v časně apoptóze jich bylo 8,69% v pozdní 33,61%. Asukamycin též vykazoval snížení životaschopnosti THP-1 a to na 75,90%. V časně apoptóze se nacházelo 7,33% buněk a v pozdní 16,10%. U ostatních mycinů byla životnost buněk kolem 94% až 91%. Jde tedy o pokles jen o několik procent. Dalším krokem bylo zvolit vhodný stimul a jeho koncentraci. THP-1 buňky byly stimulovány pomocí LPS, IL-13, IL-17, $INF\gamma$ a $TNF\alpha$ v koncentracích 10, 20, 50, a 100ng/ml. U stimulovaných buněk se po 24h inkubaci sledovaly povrchové znaky CD54 a HLA-DR.

CD54 je intercelulární adhezivní molekula také označována jako ICAM-1. Jedná se o transmembránový protein, který je u lidí kódován genem ICAM1, nacházející se na krátkém

raménku 19. chromozomu (19p13,3-p13,2) (VORABERGER *et al.* 1991). CD54 se exprimuje v nízkých koncentracích na lymfocytech a endotelu, které se nachází v tak zvaném klidovém stavu. Ke zvýšení exprese dochází po stimulaci buněk některým z prozánětlivých cytokinů, například TNF α , IFN γ či IL-1. Ke zvýšené expresi CD54 dochází konkrétně na aktivovaných T i B-lymfocytech, monocytech, makrofázích, granulocytech, dendritických buňkách a na endotelu. Existuje také rozpustná forma této adhezivní molekuly, kde se uvolňuje z povrchu buněk (YANG *et al.* 2005). CD54 se uplatňuje při adhezi imunitních buněk na endotel či při diapedéze buněk v místě zánětu, čím se podílí na rozvoji zánětlivé reakce. Jako ligandy pro CD54 receptor slouží β 2 integriny LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), CD11c/CD18 dále hyaluronan a fibrinogen. CD54 také nachází uplatnění při kontaktu mezi antigen prezentující buňkou (APC) a T-lymfocytům (LAWSON a WOLF 2009).

HLA-DR patří do MHC II. třídy nacházející se na povrchu lidských APC (monocyty, makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty). Gen pro HLA-DR se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21,3). MHC systém jako takový se vyznačuje genetickým polymorfismem. Molekula je transmembránový heterodimer skládající se ze dvou α a dvou β domén. APC na MHC II. třídy vystavuje extracelulární peptid, který fagocytovala. Peptid je prezentován Th-lymfocytům (CD4⁺ lymfocytům). Th-lymfocyty pak rozeznávají prezentovaný peptid pomocí TCR receptorů. MHC jako celek má disociaci s určitými onemocněními (BOWMAN *et al.* 1990).

LPS je hlavní složkou vnější membrány gram-negativních bakterií mikroorganismů a řadí se mezi tepelně stabilní endotoxiny. LPS slouží k udržení membránové integrity a zároveň jako ochrana před působením žlučových solí a lipofilních antibiotik. Pokud dojde k poškození či chybění LPS na membráně, bakterie nejsou životaschopné. LPS se skládá ze tří částí, z hydrofobní domény nazývané jako lipid A, z jádra, které je tvořeno oligosacharidem a distálním polysacharidem, který se běžně označuje jako O-antigen. Působení LPS vyvolává silnou imunitní odpověď (RAETZ a WHITFIELD 2002, RIETSCHHEL *et al.* 1994). LPS se váže na receptorový komplex CD14 / TLR4 / MD2, který je přítomen na mnoha typech buněk, především pak na dendritických buňkách, monocytech, makrofázích a B lymfocytech. Výsledkem stimulace LPS je produkce prozánětlivých cytokinů včetně TNF α , IL-1 (MUROI a TANAMOTO 2002). LPS aktivuje signální dráhu, kde dochází k aktivaci NF-kappa B proteinového komplexu (ZHANG *et al.* 2009). LPS buňky stimuloval a to ve všech koncentracích. Změny byly vidět jak na CD54, ale u HLA-DR došlo jen k mírnému zvýšení exprese. Tímto pokusem byly potvrzeny výzkumy, kde byla sledována exprese CD54 (XU

et al. 2008) a HLA-DR (BAQUI *et al.* 1999) u buněk stimulovaných pomocí LPS. Velkou nevýhodou však bylo, že LPS snižoval životnost buněk.

IL-13 je imunoregulační cytokin produkován aktivovanými Th2 lymfocyty podílející se na zrání a diferenciaci B-lymfocytů. Tento cytokin má důležitou úlohu v patogenezi astmatu indukovaného alergenem, přesto nepůsobí přes mechanismy, které jsou závislé na sekreci IgE. IL-13 snižuje aktivitu makrofágů a tím inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Existuje teorie využití IL-13 při léčbě B-buněčné chronické lymfocytární leukémie či Hodgkinovy choroby, kdy dochází k indukci apoptózy nádorových buněk (WYNN 2003). Podle nejnovějších poznatků se IL-13 uplatňuje nejen u astmatu, ale také u systematické sklerózy a některých gastrointestinálních zánětlivých onemocnění. Po nasednutí IL-13 na specifický receptor dojde ke spuštění signální dráhy, kde je aktivován STAT protein. (SEYFIZADEH *et al.* 2015). U IL-13 nedošlo ke stimulaci THP-1 a to v žádné koncentraci. Čímž se potvrdil jeho tlumící účinek ovlivňující makrofágy (WYNN 2003).

IL-17 je produkován Th17 lymfocyty. Patří mezi prozánětlivé cytokiny hrající důležitou roli při zánětu, u nádorových onemocnění a u autoimunitních chorob (LI Q. *et al.* 2014). IL-17 se vyznačuje pleotropním účinkem na různé typy buněk. Stimuluje makrofágy k produkci TNF α a IL-1 β . U lidských fibroblastů stimuluje produkci IL-6, IL-8 a adhezivní molekuly ICAM-1, při stimulaci granulocytů dochází k tvorbě stimulujícího faktoru G-CSF. IL-17 též ovlivňuje epitelové a endoteliální buňky. Také se uvádí průkaz IL-17 mRNA v buňkách pankreatu, žaludku a tenkého střeva. Zvýšená koncentrace IL-17 byla nalezena u pacientů s revmatoidní artritidou, s roztroušenou sklerózou (LI H. *et al.* 2000). Receptor pro IL-17 je exprimován na celé řadě typů buněk. Receptor je heterodimer skládající se z IL-17 receptoru A a IL-17 receptoru C. Po navázání IL-17 na specifický receptor dochází přes signální dráhu k aktivaci I-kappa B kináz a tedy i k NF-kappa B. Výsledkem je produkce řady cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (LI Q. *et al.* 2014). Použití inhibitorů IL-17 by mohlo mít v budoucnu terapeutické využití u nádorových onemocnění či výše zmíněných autoimunitních chorob (ORTIZ *et al.* 2015). IL-17 významně nestimuloval THP-1 buněčnou linii ani v jedné koncentraci. Přesto, že jde o prozánětlivý cytokin a specifické receptory se nachází i na buňkách mimo imunitní systém, stimulace THP-1 buněk tímto cytokinem nebyla prokázána ani u podobné studie. Zde se vědci domnívají, že uplatnění cytokinů z rodiny IL-17 je velmi rozmanité a velmi se liší svým uplatněním v zánětlivé reakci (LI H. *et al.* 2000).

Jak již bylo výše uvedeno (kapitola Přehled literatury), IFN γ patří do rodiny interferonů třídy II. a též spadá mezi prozánětlivé cytokiny účastníci se celé řady imunoregulačních reakcí. Stimulace buněk pomocí IFN γ byla velmi dobře znatelná ve všech koncentracích. Růst byl

zaznamenán u obou sledovaných povrchových znaků. V jiných pokusech byl prokázán indukční účinek $\text{IFN}\gamma$ jak u CD54 (MICKELSON *et al.* 1995) tak u HLA-DR (GUMINA *et al.* 1991). V další studii byl $\text{IFN}\gamma$ vyhodnocen jako velmi silný induktor zánětlivých reakcí. (BAYARDO *et al.* 2012).

TNF α je řazen do zánětlivých cytokinů a je produkován především makrofágy a má celou řadu funkcí (viz. kapitola Přehled literatury). U tohoto stimulu došlo ke zvýšení k výrazné expresi CD54. TNF α na expresi HLA-DR měl jen malý vliv. Zvýšená exprese CD54 se shoduje s jinou prací (MIYAZAWA *et al.* 2008), ale výsledky u HLA-DR nikoliv. V odborném článku se uvádí, že TNF α zvyšuje expresi HLA-DR na APC a tím se podílí na lepší prezentaci extracelulárních antigenů (BERTHO *et al.* 2001). V koncentraci 50ng/ml a 100ng/ml se již začala projevovat cytotoxicita tohoto stimulu. Jako nejvhodnější stimul pro další práci byl zvolen $\text{IFN}\gamma$ v koncentraci 100ng/ml a TNF α 20ng/ml.

Dalším úkolem bylo zjistit, jak moc se změní výsledky, pokud jsou myciny přidávány v různých časových intervalech již ke stimulovaným buňkám. Tento test prozradil, že není rozhodující, za jak dlouho budou myciny přidány ke stimulovaným THP-1. V závěru byl výsledek úplně stejný, i když byly myciny přidány současně se stimulem či až po 24h. V pokusech byly proto myciny přidávány rovnou se stimuly. Po těchto testech již bylo možné pracovat přímo s testovanými myciny. THP-1 buňky byly inkubovány s daným stimulem a mycinem a po 24h inkubace se měřily povrchové znaky CD54 a HLA-DR. U CD54 se měřil pouze mean jelikož všechny buňky tvořili pouze jednu pozitivní populaci na CD54. Mean udává denzitu CD54 exprimované na buňce. U HLA-DR se měřil mean, a také kolik procent buněk je pozitivní na HLA-DR. Stimulované buňky s myciny byly porovnávány s buňkami, které byly jen stimulovány. Při sledování znaku CD54, kdy byl použit stimul $\text{IFN}\gamma$, bylo zjištěno, že jediné statisticky významné snížení exprese nastalo účinkem colabomycinu E u koncentrace 2 μM . Viditelné snížení bylo také u manumycinu A v koncentracích 0,5; 1; 2; 5 μM , ale tyto výsledky nebyly statisticky významné. U exprese HLA-DR v procentech téhož stimulu došlo ke snížení jen manumycinu A a to téměř o 50%. U HLA-DR, kde se sledoval mean vyšlo statisticky významné snížení u 5 μM manumycinu A a naopak zvýšení u 1 a 2 μM deoxybomycinu. Pokles exprese jak u CD54 tak u HLA-DR nebyl zaznamenán ani u kontrolních makrolidů. Při použití TNF α byla exprese CD54 výrazně snížena u většiny mycinů. Ke statisticky významnému poklesu došlo u 0,1; 0,5; 1; 5 μM manumycinu B, u 5 μM colabomycinu E, u 0,1; 0,5; 1; 2 μM asukamycinu D, u všech koncentrací β -rubromycinu, u 0,1; 0,5; 5 μM deoxybomycinu a u všech koncentrací claritromycinu i azitromycinu dihydrate. Procentuální

zastoupení HLA-DR pokleslo jen u asukamycinu D v koncentracích 0,5; 1; 2; 5 μ M, přibližně o 10%. K nárůstu došlo u 5 μ M deoxynybomycinu o cca 40%. U měřeného meanu došlo k poklesu u 0,1; 1 μ M asukamycinu D. Statisticky významné zvýšení bylo zaznamenáno u 5 μ M deoxynybomycinu. Z těchto výsledku vyplývá, že nejvýznamnější změna nastala u exprese CD54, kdy THP-1 linie byla stimulována TNF α .

Za použití stejných stimulů byla sledována změna koncentrace různých prozánětlivých cytokinů a chemokinů v buněčném supernatantu. Měření se provedlo u 0,5; 1; 5 μ M koncentrací mycinů. U části měření došlo k technickým potížím a některé vzorky byly znehodnoceny. Proto zde nemohla být vypočítána směrodatná odchylka ani statistická významnost. Je potřeba tyto výsledky brát pouze za orientační a metodu je nutno zopakovat. Během vypracovávání diplomové práce se již metoda neopakovala, jelikož se jedná o finančně náročnou metodu. Zároveň je potřeba dostatečný počet vzorků, aby se vyplatilo metodu z finančního hlediska provést. Mezi monitorované cytokiny patří IL-1 β a IL-6, který fungují jako prozánětlivé cytokiny (viz. kapitola Přehled literatury). Dále byl sledován MIP-1 α , RANTES.

MIP-1 α též označován jako CCL3 patří mezi chemokiny podílející se na rozvoji zánětlivé reakce. Je produkován aktivovanými monocyty, makrofágy, lymfocyty a dendritickými buňkami (MAURER a von STEBUT 2004). Gen pro tento chemokin se u lidí nachází na dlouhém raménku 17. chromozomu (17q12). Jeho chemotaktický účinek působí především na T-lymfocyty, B-lymfocyty, monocyty a eozinofily (XU *et al.* 2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). U MIP-1 α se prokázal inhibiční účinek na HIV (CZAPLEWSKI *et al.* 1999).

RANTES patří mezi prozánětlivé chemokiny a je nazýván také jako CCL5. Je produkován aktivovanými T-lymfocyty, monocyty a makrofágy. Gen pro tento chemokin se nachází na dlouhém raménku na 17. chromozomu (17q12). Chemotakticky působí na monocyty, eozinofily a na paměťové Th-lymfocyty. RANTES potlačuje replikaci HIV v infikovaných buňkách a též se uplatňuje se při patogenezi astmatu (CONTI a DiGIOACCHINO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

IFN γ stimuloval THP-1 linii k produkci IL-1 β výrazně oproti kontrolním nestimulovaným buňkám. Hodnoty stimulovaných buněk se však pohybovaly jen okolo 9pg/ml. Proto by se tento výsledek měl hodnotit s opatrností. K poklesu IL-1 β došlo za přítomnosti manumycinu A, manumycinu B, colabomycinu E, asukamycinu D, β -rubromycinu, deoxynybomycinu i u kontrolního clarithromycinu. IL-6 se u nesimulovaných

buněk pohyboval okolo 0,6pg/ml a u stimulovaných okolo 4pg/ml. Dá se tedy říci, že IFN γ indukuje produkci IL-6. U některých mycinu došlo k poklesu množství IL-6 na 2pg/ml, ale bez statistické významnosti se tak malý rozdíl nedá brát za prokazatelný. Pokles nastal pouze u 0,5 μ M manumycinu A. Množství chemokinu MIP-1 α se u kontrolních THP-1 buněk pohyboval okolo 10pg/ml a u stimulovaných okolo 65pg/ml. Tedy se dá říci, že IFN γ indukuje produkci MIP- α . Pokles nastal za přítomnosti 0,5 μ M manumycinu A, 1; 5 μ M colabomycinu E. IFN γ stimuluje buňky k produkci chemokinu RANTES jen minimálně a žádný výrazný pokles za přítomnosti mycinu nebyl zaznamenán. Při použití TNF α jakožto stimulu došlo k vzestupu IL-1 β v buněčném supernatantu. U kontrolních buněk byla koncentrace IL-1 β okolo 1,4pg/ml zatím co u stimulovaných cca 46pg/ml. Ke snížení došlo u manumycinu A, manumycinu B, β -rubromycinu, deoxynybomycinu, clarithromycinu. U vyjmenovaných mycinů bylo snížení u všech koncentrací. Dále pokles bylo možné zaznamenat u 5 μ M colabomycinu E, 1; 5 μ M asukamycinu A i D, u 1; 5 μ M azithromycinu dihydrate. U IL-6 nedošlo k žádnému nárůstu u stimulovaných buněk. MIP-1 α a RANTES nebyl prozatím změřen. Při shrnutí těchto výsledků se dá říci, že IFN γ indukuje produkci IL-1 β , IL-6, MIP-1 α . To se shoduje s předešlými studiemi (BOSCO *et al.* 1994, FAGGIOLI *et al.* 1997, MASTERS *et al.* 2010). Na produkci chemokinu RANTES se podílí jen minimálně. Ve studiích je však uváděno, že IFN γ stimuluje buňky k produkci chemokinu RANTES (WAKUGAWA *et al.* 2001). Při stimulaci pomocí IFN γ kontrolní makrolidová antibiotika snížili jen produkci IL-1 β , mimo to se v tomto případě uplatnilo nejvíce testovaných mycinů. TNF α indukuje produkci IL-1 β to se shoduje s výsledky jiných výzkumů (SAKAMOTO *et al.* 2003, TIAN *et al.* 2013). IL-6 nebyl zvýšen, což je v rozporu se studií, kde je uvedeno, že TNF α se podílí na produkci IL-6 (JIAO *et al.* 2012) I u tohoto stimulu nejlépe myciny inhibovali IL-1 β .

Dalším pokusem se zjišťovalo jak myciny ovlivňují proliferaci buněk a to nestimulovaných tak stimulovaných. Jako stimul byl použit opět IFN γ o koncentraci 100ng/ml a TNF α 20ng/ml. Proliferace byla sledována po dobu 72h. Pokles proliferace, kde nebyl použit stimul, byl zaznamenán u 5 μ M manumycinu A. U manumycinu B došlo k poklesu u koncentrací 0,5; 1; 2; 5 μ M, tím se potvrzuje inhibiční účinek pro růst nádorových buněk (SHE *et al.* 2007). Dále byl pokles buněčného dělení zaznamenán u 2;5 μ M colabomycinu E, 5 μ M asukamycinu, A, 1; 2; 5 μ M asukamycinu D, u β -rubromycinu nebyl zaznamenán žádný inhibiční účinek, v případě deoxynybomycinu naopak inhibičně fungovaly všechny koncentrace, u kontrolních makrolidů byla proliferace snižená jen u 5 μ M. Při použití IFN γ došlo oproti nestimulovaným buňkám k potlačení proliferace, což potvrzuje antiproliferační

účinek tohoto stimulu (DELLACASAGRANDE *et al.* 2002). Tuto vlastnost IFN γ zřejmě mohou myciny potlačit. To se podařilo prokázat u všech koncentrací manumycinu B, colabomycinu D, asukamycinu A a kontrolního clarithromycinu. Manumycin A, β -rubromycin a azithromycin dihydrate inhibují IFN γ ve všech koncentracích kromě 5 μ M. V tomto množství sám manumycin A indukuje apoptózu. Asukamycin D pravděpodobně podporuje antiproliferační účinek IFN γ , jelikož zvýšený počet buněk oproti samotným THP-1 byl nalezen jen u 0,1 a 0,5 μ M. Deoxynybomycin buď vůbec neinhibuje účinek IFN γ nebo sám potlačuje růst buněk, jelikož křivka růstu buněk byla velmi podobná buňkám, které byly inkubovány pouze se stimulem. TNF α také inhibuje růst buněk však v menší míře než IFN γ (KIM *et al.* 2010). Při tomto testu bylo dosaženo stejných výsledků. Účinek TNF α byl inhibován ve všech koncentracích u manumycinu A, colabomycin E, β -rubromycinu, clarithromycinu a azithromycinu dihydrate. Manumycin B a asukamycin A potlačují účinek TNF α ve všech množstvích s výjimkou 5 μ M. Asukamycin D nepotlačuje antiproliferační účinek vůbec k tomu u 5 μ M je pokles proliferace ještě mnohem větší, než u buněk, které jsou inkubované pouze se stimulem. U deoxynybomycinu byl prokázán snížený růst THP-1 linie. Při hodnocení toho pokusu jako celku by se dalo říct, že myciny inhibují antiproliferační účinek IFN γ i TNF α alespoň v nějaké koncentraci. Těchto vlastností by se dalo využít u chorob, které jsou doprovázeny chronickými záněty. Většina testovaných látek v množství 5 μ M sama snižuje proliferaci buněk, což by mohlo mít uplatnění při léčbě nádorových onemocnění.

Poslední částí této práce bylo zjistit, zda inhibice produkce prozánětlivých cytokinů bude též detekovatelná na genové úrovni. Genová exprese byla prozatím testována jen u manumycinu A za použití TNF α o koncentraci 20ng/ml. Testován byl prozatím jen jeden mycin. Výběr mycinů, u kterých bude stanovena genová exprese se odvíjí od schopnosti inhibovat produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. TNF α přes signální dráhy stimuluje téměř všechny vyšetřované geny, tudíž může být účinek manumycinu A posouzen i na genové úrovni. Manumycin A o koncentraci 0,5 μ M po 4h inkubace účinně inhiboval více než dvojnásobně mRNA pro IL-1 β , IL-6 a IL-10 u THP-1 buněčné linie. mRNA pro EGR-1 byla snížena, až po 8h působení manumycinu A. Zároveň bylo zjištěno, že manumycin A podporuje expresi genů HMOX1, TNFRSF10A, IL-1R1, TICAM2 a NLRP12. Výsledky genové exprese potvrzují pokles IL-1 β v buněčném supernatantu.

Pokud by se měly testované myciny hodnotit jako celek je těžké říci, který z nich má nejlepší potenciál stát se v budoucnu léčivým přípravkem. Každý z nich má své uplatnění,

alespoň co se týče provedených testů v rámci této práce. Velkou roli též hraje, čím jsou buňky stimulovány. Hodnotit každý mycin v kontextu publikovaných prací není prozatím zcela možné, jelikož pouze nejprozkoumanější manumycin A je komerčně dostupný. Ostatní myciny jsou v začátku testování a tudíž není k dispozici příliš publikovaných výsledků, které by sloužily k porovnání. Pokud nějaké studie byly publikovány, většinou vědci volí různé metody jak myciny testovat. Proto porovnávat výsledky ve stejných metodách je prozatím nemožné. Při srovnání publikovaných informací a získaných výsledků v rámci této diplomové práce se podařilo potvrdit účinek manumycinu A, který indukuje apoptózu (SINGHA *et al.* 2013, PRASANNA *et al.* 2007, YEUNG *et al.* 2000), inhibuje antiproliferativní vlastnost IFN γ (PETANIDIS *et al.* 2013, SHE *et al.* 2007), inhibuje produkci IL-1 (PALSSON *et al.* 2000). Colabomycin E inhibuje produkci IL-1 β (PETŘÍČKOVÁ *et al.* 2014), asukamycin A indukuje apoptózu (SHIPLEY *et al.* 2009), asukamycin D inhibuje produkci IL-1 β (TANAKA *et al.* 1996, UOSAKI *et al.* 1996), deoxybomycin se vyznačuje antiproliferačním účinkem a indukuje apoptózu (EGAWA *et al.* 2000).

Polyketidy jsou látky, které jsou studovány jen krátkou dobu, což dává možnost získávat stále nové informace. Pokud se bude brát ohled na vybavení laboratoře, ve které byla diplomová práce zpracována je tu ještě celá řada možností jak myciny dále testovat. Mohou být použity další stimuly například cytokin IL-1 β , který indukuje produkci IFN γ . IFN γ se pak dá následně sledovat v buněčném supernatantu. Jako další stimul by mohl být použit IL-32, který indukuje v lidských makrofázích tvorbu TNF α a IL-8 a ty se dají opět měřit v supernatantu. Jako povrchový znak by bylo zajímavé sledovat CD47. CD47 je exprimován na většině lidských buněk a pokud dojde k poklesu CD47, je u buněk indikována apoptóza. Jedním z ochranných mechanismů u nádorových buněk je nadměrná exprese CD47 a tak není u nich vyvolávána apoptóza (WANG *et al.* 2015). Pokud by měly myciny inhibiční účinek na expresi CD47 a zároveň došlo ke snížení proliferace, dalo by se říci, že mají potencionální protinádorový účinek. Velké využití by mohl mít systém xCELLigence, zde je možno měřit nejenom proliferaci, ale také migraci buněk. Tak by se dala sledovat případná inhibice chemokinů. Další možností je THP-1 buňky stimulovat tak, aby diferenciovaly a staly se z nich zralé makrofágy (DAIGNEAULT *et al.* 2010). Další výzkum by mohl být směřován tak, aby se co nejvíce přiblížil k situaci *in vivo*. V neposlední řadě by bylo vhodné myciny otestovat na dalších buněčných liniích, zejména epiteliálního původu.

7 Souhrn

Všechny uvedené testy byly provedeny na THP-1 buněčné linii, která byla stimulována buď IFN γ (100ng/ml) či TNF α (20ng/ml). Při testování potenciálního cytotoxického efektu, bylo zjištěno, že se jedná o indukci apoptózy nikoliv o nekrózu. Nejvíce indukoval apoptózu 5 μ M manumycinu A, kdy bylo 58,78% buněk živých, 21,56% v časně apoptóze a 19,50% v pozdní apoptóze. 5 μ M deoxynybomycin snížil životnost buněk na 57,20% v časně apoptóze jich bylo 8,69% v pozdní 33,61%. 5 μ M asukamycin též vykazoval snížení životaschopnosti THP-1 a to na 75,90%, v časně apoptóze se nacházelo 7,33% buněk a v pozdní 16,10%.

Při sledování povrchového znaku CD54 za použití IFN γ jako stimulu bylo zjištěno, že jediné statistické snížení exprese nastalo jen u 2 μ M colabomycinu E. U exprese HLA-DR v procentech a téhož stimulu došlo ke snížení jen u 5 μ M manumycinu A téměř o 50%. HLA-DR, kde se sledoval mean, vyšlo statisticky významné snížení u 5 μ M manumycinu A a naopak zvýšení u 1 a 2 μ M deoxynybomycinu. Při použití TNF α byla exprese CD54 výrazně snížena u většiny mycinů. K statisticky významnému poklesu došlo u 0,1; 0,5; 1; 5 μ M manumycinu B, u 5 μ M colabomycinu E, u 0,1; 0,5; 1; 2 μ M asukamycinu D, u 0,1; 0,5; 5 μ M deoxynybomycinu, u β -rubromycinu, claritromycinu a azitromycinu dihydrate ve všech koncentracích. Procentuální zastoupení HLA-DR pokleslo jen u asukamycinu D v koncentracích 0,5; 1; 2; 5 μ M, přibližně o 10%. K nárůstu došlo u 5 μ M deoxynybomycinu o cca 40%. U měřeného meanu došlo k poklesu u 0,1; 1 μ M asukamycinu D. Statisticky významné zvýšení bylo zaznamenáno u 5 μ M deoxynybomycinu. Z těchto výsledku vyplývá, že nejvýznamnější inhibice navozená testovanými polyketidy nastala u exprese CD54, kdy THP-1 linie byla stimulována TNF α .

Při sledování zda myciny ovlivňují produkci prozánětlivých cytokinů, která byla indukována IFN γ , byl zjištěn pokles IL-1 β za přítomnosti manumycinu A, manumycinu B, colabomycinu E, asukamycinu D, β -rubromycinu, deoxynybomycinu i u kontrolního clarithromycinu ve všech sledovaných koncentracích (0,5; 1; 5 μ M). Množství chemokinu MIP-1 α bylo sníženo pouze za přítomnosti 0,5 μ M manumycinu A, a 1; 5 μ M colabomycinu E. Při použití TNF α jakožto stimulu došlo k poklesu IL-1 β u manumycinu A, manumycinu B, β -rubromycinu, deoxynybomycinu, clarithromycinu ve všech měřených koncentracích (0,5; 1; 5 μ M).

Pokusy vyhodnocující vliv mycinů na proliferaci buněk prokázaly, že pokud jsou THP-1 buňky inkubovány pouze s myciny bez stimulu pokles růstu buněk byl zaznamenán u manumycinu B v koncentracích 0,5; 1; 2; 5 μ M, tím se potvrzuje jeho inhibiční účinek pro růst

nádorových buněk. Oproti tomu β -rubromycin neměl žádný inhibiční účinek. V případě deoxynybomycinu naopak inhibičně fungovaly všechny koncentrace. Vlivem $\text{IFN}\gamma$ došlo oproti nestimulovaným buňkám k potlačení proliferace, což potvrzuje antiproliferační účinek tohoto stimulu. Tuto vlastnost $\text{IFN}\gamma$ umí však myciny potlačit. To se podařilo prokázat u všech koncentrací manumycinu B, colabomycinu D, asukamycinu A a kontrolního clarithromycinu. Antiproliferační účinek $\text{TNF}\alpha$ byl inhibován ve všech koncentracích u manumycinu A, colabomycin E, β -rubromycinu, clarithromycinu a azithromycinu dihydrate.

Genová exprese byla prozatím testována jen u manumycinu A za stimulace pomocí $\text{TNF}\alpha$. Manumycin A o koncentraci $0,5\mu\text{M}$ po 4h inkubace účinně inhiboval více než dvojnásobně mRNA pro $\text{IL-1}\beta$ u THP-1 buněčné linie, což koreluje s poklesem koncentrace $\text{IL-1}\beta$ v buněčném supernatantu.

Seznam použité literatury

- Ahmad R., Sylvester J., Zafarullah M. (2007): MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation. *Cellular signalling* 2007; 19:2549-57.
- Alberts R., Johnson L., Raff R., Walter B. (1997): Garland Pub, New York
- Atkinson D. J., Brimble M. A. (2015): Isolation, biological activity, biosynthesis and synthetic studies towards the rubromycin family of natural products. *Nat Prod Rep.* 2015 May 27;32(6):811-40. doi: 10.1039/c4np00153b.
- Bastard J. P., Jardel C., Delattre J., Hainque B., Bruckert E., Oberlin F. (1999): Evidence for a link between adipose tissue interleukin6 content and serum Creactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation.* 1999 Apr 27;99(16):2221-2.
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. (1992): Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):97-101.
- Baqui A. A., Meiller T. F., Kelley J. I., Turng B. F., Falkler W. A. (1999): Antigen activation of THP-1 human monocytic cells after stimulation with lipopolysaccharide from oral microorganisms and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Periodontal Res.* 1999 May;34(4):203-13.
- Banks W. A., Kastin A. J., Gutierrez E. G. (1994): Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett.* 1994 Sep 26;179(1-2):53-6.
- Bayardo M., Punzi F., Bondar C., Chopita N., Chirido F. (2012): Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumour necrosis factor- α in human small intestine. *Clin Exp Immunol.* 2012 Apr;168(1):95-104.
- Bernier M., Kwon Y. K., Pandey S. K., Zhu T. N., Zhao R. J., Maciuk A., He H. J., Decabo R., Kole S. (2006): Binding of manumycin A inhibits IkappaB kinase beta activity. *J Biol Chem.* 2006 Feb 3;281(5):2551-61.
- Bertho N., Laupèze B., Mooney N., Le Berre C., Charron D., Drénou B., Fauchet R. (2001): HLA-DR mediated cell death is associated with, but not induced by TNF-alpha secretion in APC. *Hum Immunol.* 2001 Feb;62(2):106-12.
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J., Chang M., Pan Y., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A. (1985): Identity of Tumour Necrosis Factor and the Macrophage-Secreted Factor Cachectin. *Nature.* 316 (8): 552-554.
- Bosco M. C., Gusella G. L., Espinoza-Delgado I., Longo D. L., Varesio L. (2007): Requirement of reactive oxygen species generation in apoptosis of leukemia cells induced by 2-methoxyestradiol. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 Jul;28(7):1037-44.

Bosco M. C., Gusella G. L., Espinoza-Delgado I., Longo D. L., Varesio L. (1994): Interferon gamma upregulates interleukin-8 gene expression in human monocytic cells by a posttranscriptional mechanism. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):537-42.

Bosnar M., Kelnerić Z., Munić V., Eraković V., Parnham M. J. (2005): Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jun;49(6):2372-7.

Bowman M. R., MacFerrin K. D., Schreiber S. L., Burakoff S. J. (1990): Identification and structural analysis of residues in the V1 region of CD4 involved in interaction with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 and class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(22):9052-6.

Bunet R., Riclea R., Laureti L., Hôtel L., Paris C., Girardet J. M., Spitteller D., Dickschat J. S., Leblond P., Aigle B. (2014): A single Sfp-type phosphopantetheinyl transferase plays a major role in the biosynthesis of PKS and NRPS derived metabolites in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *PloS One*. 2014 Jan 31;9(1):e87607.

Conti P., DiGioacchino M. (2001): MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*. 2001 May-Jun;22(3):133-7.

Czaplewski L. G., McKeating J., Craven C. J., Higgins L. D., Appay V., Brown A., Dudgeon T., Howard L.A., Meyers T., Owen J., Palan S.R., Tan P., Wilson G., Woods N. R., Heyworth C. M., Lord B. I., Brotherton D., Christison R., Craig S., Cribbes S., Edwards R. M., Evans S. J., Gilbert R., Morgan P., Randle E., Schofield N., Varley P. G., Fisher J., Waltho J. P., Hunter M. G. (1999): Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants., *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16077-84.

Daigneault M., Preston J. A., Marriott H. M., Whyte M. K., Dockrell D. H. (2010): The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One*. 2010 Jan 13;5(1):e8668.

Dellacasagrande J., Ghigo E., Raoult D., Capo C., Mege J. L. (2002): IFN-gamma-induced apoptosis and microbicidal activity in monocytes harboring the intracellular bacterium *Coxiella burnetii* require membrane TNF and homotypic cell adherence. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6309-15.

Dinarello C. A. (2000): Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Aug;118(2):503-8.

Dinarello C.A. (2005): Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201:1355-9.

Dinareello C.A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.

Faggioli L., Merola M., Hiscott J., Furia A., Monese R., Tovey M., Palmieri M.(1997): Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1997 Nov;27(11):3022-30.

Febbraio M. A., Pedersen B. K.(2005): Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ. *Exerc Sport Sci Rev.* 2005 Jul;33(3):14-9.

Gao X., Ray R., Xiao Y., Ishida K., Ray P. (2010): Macrolide antibiotics improve chemotactic and phagocytic capacity as well as reduce inflammation in sulfur mustard-exposed monocytes. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 Apr;23(2):97-106.

Garbers C., Hermanns H. M., Schaper F., Muller-Newen G., Grotzinger J., Rose-John S., Scheller J. (2012): Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 23 2012 85-97.

Gumina R. J., Freire-Moar J., DeYoung L., Webb D. R., Devens B. H. (1991): Transduction of the IFN-gamma signal for HLA-DR expression in the promonocytic line THP-1 involves a late-acting PKC activity. *Cell Immunol.* 1991 Dec;138(2):265-79.

Hébert C. A., Lusinskas F. W., Kiely J. M., Luis E. A., Darbonne W. C., Bennett G. L., Liu C. C., Obin M. S., Gimbrone M. A. Jr, Baker J. B.(1990): Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J Immunol.* 1990 Nov 1;145(9):3033-40.

Horii Y., Muraguchi A., Suematsu S., Matsuda T., Yoshizaki K., Hirano T., Kishimoto T. (1988): Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *Journal of immunology* 1988; 141:1529-35.

Chanput W., Mes J. J., Wichers H. J. (2014): THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014 Nov;23(1):37-45.

Charles A., Dinareello C.A (2000): Proinflammatory Cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-508

Chen G., Wang G. Y., Li X., Waters B., Davies J. (2000): Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Antibiot (Tokyo).* 2000 Oct;53(10):1145-53.

Chopra T., Banerjee S., Gupta S., Yadav G., Anand S., Surolia A., Roy R. P., Mohanty D., Gokhale R.S. (2008): Novel intermolecular iterative mechanism for biosynthesis of mycoketide catalyzed by a bimodularpolyketide synthase. *PloS Biol.* 2008 Jul 8;6(7):e163.

Ikegaya S., Inai K., Iwasaki H., Naiki H., Ueda T. (2009): Azithromycin reduces tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 monocytic cells by modification of stress response and p38 MAPK pathway. *J Chemother.* 2009 Aug;21(4):396-402.

Ives T. J., Schwab U. E., Ward E. S., Butts J. D., Hall I. H. (2001): Disposition and functions of clarithromycin in human THP-1 monocytes during stimulated and unstimulated conditions. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001;110(3-4):183-208

Janeway C., Travers P., Walport M., Capra J. (1999): *The Immune System in Health and Disease.* New York, N.Y.: Garland Publishers. 1999.

Jiao Z., Wang W., Ma J., Wang S., Su Z., Xu H. (2012): Notch signaling mediates TNF- α -induced IL-6 production in cultured fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:350209.

Kim J. J., Lee S. B., Park J. K., Yoo Y. D. (2010): TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ.* 2010 Sep;17(9):1420-34.

Kim Y., Liesack W. (2015): Differential assemblage of functional units in paddy soil microbiomes. *PloS One* 2015 Apr 21;10(4)

Kikuchi T., Hagiwara K., Honda Y., Gomi K., Kobayashi T., Takahashi H., Tokue Y., Watanabe A., Nukiwa T. (2002): Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *J Antimicrob Chemother.* 2002 May;49(5):745-55.

Kohno J., Nishio M., Kawano K., Nakanishi N., Suzuki S., Uchida T., Komatsubara S. (1996): TMC-1 A, B, C and D, new antibiotics of the manumycin group produced by *Streptomyces* sp. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo).* 1996 Dec;49(12):1212-20.

Lawson C., Wolf S. (2009): ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009 Jan-Feb;61(1):22-32.

Lemaire S., Van Bambeke F., Tulkens P.M. (2009): Cellular accumulation and pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of CEM-101, a novel fluoroketolide, against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila* in human THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):3734-43.

Li H., Chen J., Huang A., Stinson J., Heldens S., Foster J., Dowd P., Gurney A. L., Wood W. I. (2000): Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):773-8.

Li J., Mo H. Y., Xiong G., Zhang L., He J., Huang Z. F., Liu Z. W., Chen Q. Y., Du Z. M., Zheng L. M., Qian C. N., Zeng Y. X.(2012): Tumor microenvironment macrophage inhibitory factor directs the accumulation of interleukin-17-producing tumor-infiltrating lymphocytes and predicts favorable survival in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Biol Chem.* 2012 Oct 12;287(42):35484-95.

Li J. G., She M. R., Lu C. Y., Wei S. S., Xia P.F, Lu Z. S., Peng Q. (2014): Manumycin induces apoptosis in prostate cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2014 May 22;7:771-7.

Liu X., Ye L., Bai Y., Mojidi H., Simister N. E., Zhu X. (2008): Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):449-63.

Li Q., Liu L., Zhang Q., Liu S., Ge D., You Z. (2014): Interleukin-17 Indirectly Promotes M2 Macrophage Differentiation through Stimulation of COX-2/PGE2 Pathway in the Cancer Cells. *Cancer Res Treat.* 2014 Jul;46(3):297-306.

Masters S. L., Mielke L. A., Cornish A. L., Sutton C. E., O'Donnell J., Cengia L. H., Roberts A. W., Wicks I. P., Mills K. H., Croker B. A. (2010): Regulation of interleukin-1beta by interferon-gamma is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production. *EMBO Rep.* 2010 Aug;11(8):640-6.

Maurer M., von Stebut E. (2004): Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Oct;36(10):1882-6.

Mehra S., Charaniya S., Takano E., Hu W. S. (2008): A bistable gene switch for antibiotic biosynthesis: the butyrolactone regulon in *Streptomyces coelicolor*. *PloS One.* 2008 Jul 16;3(7):e2724.

Mehta K., Lopez-Berestein G. (1986): Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer research.* 1986;46(3):1388-1394.

Mickelson J. K., Kukielka G., Bravenec J. S., Mainolfi E., Rothlein R., Hawkins H. K., Kelly J. H., Smith C. W. (1995): Differential expression and release of CD54 induced by cytokines. *Hepatology*. 1995 Sep;22(3):866-75.

Miyazawa M., Ito Y., Kosaka N., Nukada Y., Sakaguchi H., Suzuki H., Nishiyama N. (2008): Role of TNF-alpha and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure. *J Toxicol Sci*. 2008 Feb;33(1):71-83.

Mizushina Y., Takeuchi T., Sugawara F., Yoshida H. (2012): Anti-cancer targeting telomerase inhibitors: β -rubromycin and oleic acid. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Oct;12(11):1135-43. Review.

Mizushina Y., Ueno T., Oda M., Yamaguchi T., Saneyoshi M., Sakaguchi K. (2000): The biochemical mode of inhibition of DNA polymerase beta by alpha-rubromycin. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18;1523(2-3):172-81.

Modi W. S., Dean M., Seunanz H. N., Mukaida N., Matsushima K., O'Brien S. J. (1990): Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet*. 1990 Jan;84(2):185-7.

Murray J., Barbara J., Dunkley S., Lopez A., Van Ostade X., Condliffe I., Haslett C., Chilvers E. (1997): Regulation of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor-Alpha: Requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for Induction of Apoptosis In Vitro. *Blood*. 90 (7): 2772-2783.

Muroi, M., Tanamoto, K. (2002): The polysaccharide portion plays an indispensable role in Salmonella lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B through human Toll-like receptor-4. *Infect. Immun.*, 70, 60346047.

Oeckinghaus A. and Ghosh S. (2009): The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct; 1(4): a000034.

Olano C., García I., González A., Rodriguez M., Rozas D., Rubio J., Sánchez-Hidalgo M., Braña A. F., Méndez C., Salas J. A. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microb Biotechnol*. 2014 May;7(3):242-56.

Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. (2001): Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 9;98(21):12215-20. Epub 2001 Sep 25.

Omura S., Kitao C., Tanaka H., Oiwa R., Takahashi Y. (1976): A new antibiotic, asukamycin, produced by *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976 Sep;29(9):876-81.

Ortiz M. L., Kumar V., Martner A., Mony S, Donthireddy L., Condamine T., Seykora J., Knight S. C., Malietzis G., Lee G. H., Moorghen M., Lenox B., Luetkeke N., Celis E., Gabrilovich D. (2015): Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 2015 Mar 9;212(3):351-67.

Palsson E. M., Popoff M., Thelestam M., O'Neill L. A. (2000): Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7818-25.

Petanidis S., Anastakis D., Argyraki M., Hadzopoulou-Cladaras M., Salifoglou A. (2013): Differential expression of IL-17, 22 and 23 in the progression of colorectal cancer in patients with K-ras mutation: Ras signal inhibition and crosstalk with GM-CSF and IFN- γ . *PloS One*. 2013 Sep 6;8(9):e73616.

Petříčková K., Pospíšil S, Kuzma M., Tylová T., Jágr M., Tomek P., Chroňáková A., Brabcová E., Anděra L., Křišťufek V., Petříček M.(2014): Biosynthesis of colabomycin E, a new manumycin-family metabolite, involves an unusual chain-length factor. *Chembiochem*. 2014 Jun 16;15(9):1334-45.

Prasanna S. J., Saha B., Nandi D. (2007): Involvement of oxidative and nitrosative stress in modulation of gene expression and functional responses by IFN γ . *Int Immunol*. 2007 Jul;19(7):867-79.

Raetz CH. R. H., Whitfield CH. (2002): Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71: 635–700.

Rietschel, E.T., et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function (review). *FASEB J.*, 8, 217225.

Rodríguez H., Rico S., Díaz M., Santamaría R. I. (2013): Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microb Cell Fact*. 2013 Dec 19;12:127.

Rui Z., Petricková K., Skanta F., Pospíšil S., Yang Y., Chen C. Y., Tsai S. F., Floss H. G., Petříček M., Yu T. W. (2010): Biochemical and genetic insights into asukamycin biosynthesis. *J Biol Chem.* 2010 Aug 6;285(32):24915-24.

Sáčková V., Kuliková L., Kello M., Uhrinová I., Fedoročko P. (2011): Enhanced antiproliferative and apoptotic response of HT-29 adenocarcinoma cells to combination of photoactivated hypericin and farnesyltransferase inhibitor manumycin A. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):8388-405.

Sadir R., Forest E., Lortat-Jacob H. (1998): The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation. *J Biol Chem.* 1998 May 1;273(18):10919-25.

Sakamoto Y., Harada T., Horie S., Iba Y., Taniguchi F., Yoshida S., Iwabe T., Terakawa N. (2003): Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):730-5.

Seyfizadeh N., Seyfizadeh N., Babaloo Z., Gharibi T. (2015): Interleukin-13 as an Important Mediator: A Review on its Roles in Some Human Diseases *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 2015. 0(0).

Shapiro H. M. (2005): *Practical Flow Cytometry.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 Jul;28(7):1037-44.

She M., Yang H., Sun L., Yeung S. C. (2006): Redox control of manumycin A-induced apoptosis in anaplastic thyroid cancer cells: involvement of the xenobiotic apoptotic pathway. *Cancer Biol Ther.* 2006 Mar;5(3):275-80. Epub 2006 Mar 6.

Shiple P. R., Donnelly C. C., Le C. H., Bernauer A. D., Klegeris A. (2009): Antitumor activity of asukamycin, a secondary metabolite from the actinomycete bacterium *Streptomyces nodosus* subspecies *asukaensis*. *Int J Mol Med.* 2009 Nov;24(5):711-5.

Schildberger A., Rossmann E., Eichhorn T., Strassl K., Weber V. (2013): Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:697972.

Schoenborn J. R., Wilson C. B. (2007): Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101

Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89.

Nie H., Zheng Y., Li R., Guo T.B., He D., Fang L., Liu X., Xiao L., Chen X., Wan B., Chin Y. E., Zhang J. Z. (2013): Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2013 Mar;19(3):322-8.

Simpson R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews, and L. D. (1997): Ward Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* 1997 May; 6(5): 929–955.

Singha P. K., Pandeswara S., Venkatachalam M. A., Saikumar P. (2013): Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death. *Cell Death Dis.* 2013 Jan 17;4:e457. Doi: 10.1038/cddis.2012.192.

Snustad D. P., Simmons M. J. (2012): John Wiley & Sons, Inc., Hoboken

Steube K. G., Meyer C., Drexler H. G. (2000): Multiple regulation of constitutive and induced interleukin 8 secretion in human myelomonocytic cell lines. *Cytokine.* 2000 Aug;12(8):1236-9.

Thomas A. Wynn (2003): IL-13 effector functions. *Annual Review of Immunology Vol. 21:* 425-456.

Tian J., Chen J. W., Gao J. S., Li L., Xie X. (2013): Resveratrol inhibits TNF- α -induced IL-1 β , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol Int.* 2013 Jul;33(7):1829-35.

Tong J., Liu Z. C., Wang D. X. (2011): Azithromycin acts as an immunomodulatory agent to suppress the expression of TREM-1 in *Bacillus pyocyanus*-induced sepsis. *Immunol Lett.* 2011 Aug 30;138(2):137-43.

Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 1980;26(2):171-176.

Ueki M., Koshiro N., Aono H., Kawatani M., Uramoto M., Kawasaki H., Osada H. (2013): Isolation of new polyketide metabolites, linearolides A and B, from *Streptomyces* sp. RK95-74. *J Antibiot (Tokyo).* 2013 Jun;66(6):333-7.

Ueno T., Takahashi H., Oda M., Mizunuma M., Yokoyama A., Goto Y., Mizushima Y., Sakaguchi K., Hayashi H. (2000): Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety. *Biochemistry*. 2000 May 23;39(20):5995-6002.

Van Damme J., Rampart M., Conings R., Decock B., Van Osselaer N., Willems J., Billiau A. (1990): The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur J Immunol*. 1990 Sep;20(9):2113-8.

Voraberger G., Schäfer R., Stratowa C. (1991): Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol*. 1991 Oct 15;147(8):2777-86.

Wakugawa M., Nakamura K., Akatsuka M., Nakagawa H, Tamaki K. (2001): Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology*. 2001;202(3):239-45.

Wang Y, Yin C., Feng L., Wang C., Sheng G. (2015): Ara-C and anti-CD47 antibody combination therapy eliminates acute monocytic leukemia THP-1 cells in vivo and in vitro. *Genet Mol Res*. 2015 May 25;14(2):5630-41.

Xie P., Sheng Y., Ito T., Mahmud T. (2012): Transcriptional regulation and increased production of asukamycin in engineered *Streptomyces nodosus* subsp. *Asukaensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Oct;96(2):451-60.

Xu J. H., Long L., Tang Y.C., Zhang J. T., Hut H. T., Tang F. R. (2009): CCR3, CCR2A and macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the mouse hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus (PISE). *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009 Oct;35(5):496-514.

Xu H., Liew L. N., Kuo I C., Huang C.H., Goh D.L., Chua K.Y. (2008): The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology*. 2008 Oct; 125(2): 218–228.

Yanagida H., Kaibori M., Yamada M., Habara K., Yokoigawa N., Kwon A.H., Kamiyama Y., Okumura T. (2004): Induction of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes isolated from rats with ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2004; 36:1962-4.

Yang L., Froio R. M., Sciuto T. E., Dvorak A. M., Alon R., Luscinskas F. W. (2005): ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):584-92. Epub 2005 Apr 5.

Yeung S. C., Xu G., Pan J., Christgen M., Bamiagis A. (2000): Manumycin enhances the cytotoxic effect of paclitaxel on anaplastic thyroid carcinoma cells. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3):650-6.

Yuan A., Chen J. J., Yao P. L., Yang P. C.(2005): The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:853-65.

Zachlederova M., Jarolim P. (2006): The dynamics of gene expression in human lung microvascular endothelial cells after stimulation with inflammatory cytokines. *Physiol Res* 2006; 55:39-47.

Zhang X., Cao J., Jiang L., Zhong L. (2009): Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells. *Biol Pharm Bull*. 2009 Apr;32(4):578-82.

Ziemert N., Lechner A., Wietz M., Millán-Aguiñaga N., Chavarria K. L., Jensen P. R.(2014): Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 25;111(12):E1130-9.