

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Klára Dáňová**

**Úloha buněk přirozené imunity v patogenezi celiakie**

The role of innate immunity cells in the pathogenesis of celiac disease

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Lenka Palová Jelínková, Ph.D.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze, 20.8. 2012

---

Podpis

Práce vznikla s podporou na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (RVO: 61388971). Prostředky vynaložené na tuto práci byly hrazeny z grantů GA310/09/1640 a GA310/07/0414 z Grantové agentury České republiky.

Děkuji své školitelce, RNDr. Lence Palové Jelínkové, Ph.D., za veškerou pomoc a rady, které mi během přípravy mé diplomové práce poskytla. Dále děkuji doc. RNDr. Ludmile Tučkové, DrSc za její cenné rady a za to, že mi umožnila diplomovou práci u ní v laboratoři vypracovat. Děkuji také všem členům Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za příjemné pracovní prostředí, zejména Mgr. Haně Drašarové za její vstřícnost, ochotu a příjemnou spolupráci. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině a blízkým za jejich podporu a trpělivost.

## Abstrakt

Celiakie je autoimunitní onemocnění, ke kterému dochází u vnímavých jedinců po požití stravy obsahující lepek. Lepek (neboli gluten) a jeho monomerní frakce, gliadin, vyvolávají u pacientů s celiakií zánětlivé poškození střevní sliznice. Toto poškození je způsobeno buňkami imunitního systému, jež na setkání s peptidy lepku reagují silnou aktivací. Peptidy lepku mají schopnost aktivovat jak buňky adaptivního, tak buňky přirozeného imunitního systému. Tato práce je zaměřena na produkci interleukinu (IL)-1 u antigen prezentujících buněk stimulovaných štěpeným gliadinem. Monocyty a mononukleární buňky izolované z periferní krve (PBMC, z angl. peripheral blood mononuclear cell) pacientů s celiakií po stimulaci gliadinem sekretují významně více IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  než buňky zdravých dárců. Expresi IL-1 $\beta$  u PBMC izolovaných z krve pacientů s celiakií a stimulovaných gliadinem reguluje signální kaskáda, která zahrnuje kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Na myších dendritických buňkách připravených z prekurzorů z kostní dřeně (BMDC, z angl. bone marrow-derived dendritic cell) byla navíc určena role adaptorových proteinů MyD88 a TRIF a receptorů TLR2 a TLR4 (z angl. Toll-like receptor 2/4) v tomto procesu. Maturaci prekurzorové formy IL-1 $\beta$  u PBMC i myších BMDC stimulovaných gliadinem zajišťuje kaspáza-1. Maturace a sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC izolovaných z krve pacientů s celiakií a stimulovaných gliadinem je závislá na uvolňování draselných iontů z buňky a produkci reaktivních kyslíkatých intermediátů v buněčném cytozolu. Kromě kaspázy-1 jsou pro sekreci IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem nutné také proteiny NLRP3 (z angl. nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3) a ASC (z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain – CARD), tedy receptorový a adaptorový protein inflamazómového komplexu NLRP3. Celkově tato práce mapuje molekuly a mechanismy, které zajišťují produkci IL-1 $\beta$  v buňkách stimulovaných štěpeným gliadinem.

**Klíčová slova:** celiakie, gliadin, interleukin-1 $\beta$ , kaspáza-1

## Abstract

Celiac disease is an autoimmune disease which occurs in susceptible individuals after ingestion of food containing gluten. Gluten and its monomeric fraction gliadin induce inflammatory damage of the small intestine by activating the immune cells that react strongly to gluten peptides. Gluten peptides have the ability to activate cells of adaptive as well as innate immune system. This work is focused on the production of interleukin (IL)-1 in antigen presenting cells stimulated with peptic gliadin digest. We found that monocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from blood of celiac patients secrete significantly more IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  than cells of healthy donors after stimulation with gliadin digest. The gliadin-induced IL-1 $\beta$  expression is controlled by a signaling cascade that includes MAPK kinase family molecules and transcription factor NF- $\kappa$ B. Moreover, we found that the adaptor proteins MyD88 and TRIF as well as Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 play a role in the signaling cascade underlying gliadin-induced IL-1 $\beta$  expression by using murine bone marrow derived dendritic cells (BMDC). The precursor form of IL-1 $\beta$  in gliadin-stimulated PBMC and murine BMDC is matured by caspase-1. In celiac PBMC the gliadin-induced maturation and secretion of IL-1 $\beta$  depends on the potassium ions release from the cells and the production of reactive oxygen species in the cell cytosol. Finally, in addition to caspase-1, the NLRP3 protein (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3) and ASC protein (the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain – CARD), two members of NLRP3 inflammasome complex, are required for gliadin-induced IL-1 $\beta$  production in BMDC. Overall, this work presents the molecules and mechanisms that enable the production of IL-1 $\beta$  in cells stimulated with gliadin digest.

**Key words:** celiac disease, gliadin, interleukin-1 $\beta$ , caspase-1

# Obsah

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Seznam použitých zkratk  | 9  |
| 2       | Úvod a cíle práce  | 12 |
| 3       | Literární přehled  | 13 |
| 3.1     | Celiakie   | 13 |
| 3.1.1   | Klinické symptomy a diagnostika  | 13 |
| 3.1.2   | Léčba  | 14 |
| 3.1.3   | Příčiny vzniku celiakie  | 15 |
| 3.1.3.1 | Genetické predispozice   | 15 |
| 3.1.3.2 | Lepek  | 16 |
| 3.1.3.3 | Kofaktory vnějšího prostředí   | 17 |
| 3.2     | Patogeneze celiakie  | 18 |
| 3.2.1   | Štěpení lepku v trávicím traktu  | 18 |
| 3.2.2   | Prostupování gliadinových peptidů střevní bariérou                                     | 18 |
| 3.2.3   | Posttranslační úpravy gliadinových peptidů   | 19 |
| 3.2.4   | Imunitní odpověď na gliadin zprostředkovaná T buňkami                                  | 19 |
| 3.3     | Mechanismy přirozené imunity v patogenezi celiakie                                     | 21 |
| 3.3.1   | Účinky gliadinu na střevní epitelální buňky  | 21 |
| 3.3.2   | Účinky gliadinu na antigen prezentující buňky a molekulární mechanismy jejich aktivace | 22 |
| 3.4     | Interleukin-1 $\beta$ a další členové rodiny interleukinu-1                            | 23 |
| 3.4.1   | Signální dráhy řídicí expresi pro-interleukinu-1 $\beta$                               | 24 |
| 3.4.2   | Maturace pro-interleukinu-1 $\beta$  | 26 |
| 3.4.2.1 | Štěpení pro-interleukinu-1 $\beta$ kaspázou-1  | 26 |
| 3.4.2.2 | Dráha nezávislá na kaspáze-1   | 33 |
| 3.4.3   | Uvolňování interleukinu-1 $\beta$ z buňky  | 34 |
| 3.4.4   | Význam interleukinu-1 $\beta$ u autoimunitních onemocnění                              | 35 |
| 4       | Experimentální část  | 37 |
| 4.1     | Materiál   | 37 |
| 4.1.1   | Přístroje  | 37 |
| 4.1.2   | Seznam použitých chemikálií  | 38 |
| 4.1.3   | Použité buňky  | 40 |
| 4.1.3.1 | Lidské PBMC a monocyty   | 40 |
| 4.1.3.2 | Myší BMDC  | 40 |
| 4.1.4   | Seznam použitých inhibitorů  | 40 |
| 4.1.5   | Seznam použitých protilátek  | 41 |
| 4.1.6   | Připravovaná kultivačních média  | 41 |
| 4.1.7   | Připravované roztoky a pufry   | 42 |
| 4.2     | Metody   | 45 |
| 4.2.1   | Příprava gliadinových fragmentů enzymatickým štěpením                                  | 45 |
| 4.2.2   | Příprava buněk   | 46 |
| 4.2.2.1 | Izolace lidských PBMC  | 46 |
| 4.2.2.2 | Izolace lidských monocytů z PBMC   | 46 |
| 4.2.2.3 | Izolace a diferenciacce myších BMDC  | 47 |
| 4.2.2.4 | Stanovení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce  | 47 |
| 4.2.3   | Stanovení cytokinové sekrece ELISA testem  | 48 |
| 4.2.3.1 | Stimulace buněk  | 48 |
| 4.2.3.2 | ELISA test   | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.4 Stanovení proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a Western blotu .....   | 51 |
| 4.2.4.1 Stimulace buněk.....   | 51 |
| 4.2.4.2 Příprava buněčných lyzátů.....   | 51 |
| 4.2.4.3 Stanovení koncentrace proteinů.....  | 52 |
| 4.2.4.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....   | 53 |
| 4.2.4.5 Western Blot .....   | 53 |
| 4.2.5 Stanovení aktivace kaspázy-1 průtokovou cytometrií .....   | 55 |
| 4.2.5.1 Stimulace buněk.....   | 55 |
| 4.2.5.2 Analýza průtokovou cytometrií .....  | 55 |
| 5 Výsledky .....   | 57 |
| 5.1 Gliadin indukuje sekreci IL-1 $\beta$ a IL-1 $\alpha$ z PBMC a monocytů získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií.....  | 57 |
| 5.2 Gliadin indukuje expresi a maturaci pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií .....   | 59 |
| 5.3 Maturace pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií stimulovaných gliadinem je zprostředkována kaspázou-1.....   | 60 |
| 5.4 Produkce IL-1 $\beta$ indukovaná gliadinem u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií je závislá na uvolňování draselných iontů a produkci ROS.....                                   | 64 |
| 5.5 Gliadinem indukovaná exprese pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů je řízena signálními drahami, v nichž jsou zapojeny kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF- $\kappa$ B ..... | 67 |
| 5.6 Pro sekreci IL-1 $\beta$ u myších BMDC stimulovaných gliadinem je vyžadována kaspáza-1 a proteiny NLRP3 a ASC.....   | 70 |
| 5.7 V dráze řídicí expresi pro-IL-1 $\beta$ u myších BMDC stimulovaných gliadinem se uplatňuje signalizace receptory TLR, jež zahrnuje proteiny MyD88 a TRIF.....  | 73 |
| 6 Diskuze .....  | 78 |
| 7 Souhrn .....   | 85 |
| 8 Použitá literatura .....   | 86 |



# 1 Seznam použitých zkratek

|        |   |
|--------|---|
| AK     | aminokyselina   |
| AP-1   | aktivační protein 1   |
| APC    | antigen prezentující buňka  |
| APS    | persíran amonný   |
| ASC    | z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain – CARD        |
| ATP    | adenosin-5'-trifosfát   |
| BCA    | kyselina bicinchoninová   |
| BMDC   | dendritická buňka derivovaná z prekursoru z kostní dřeně (z angl. bone marrow-derived dendritic cell) |
| BMDM   | makrofág derivovaný z prekursoru z kostní dřeně (z angl. bone marrow-derived macrophage)              |
| BSA    | bovinní sérový albumin  |
| CARD   | doména vázající kaspázu (z angl. caspase recruitment domain)  |
| CTL    | cytotoxická T buňka (z angl. cytotoxic T lymphocyte)  |
| DAMP   | struktury asociované s nebezpečím (z angl. danger-associated molecular pattern)                       |
| DC     | dendritická buňka   |
| DMFA   | N,N-dimethylformamid  |
| DMSO   | dimethylsulfoxid  |
| DTT    | dithiothreitol  |
| FBS    | fetální bovinní sérum   |
| GM-CSF | granulocytární, monocytární růstový faktor  |
| HLA    | lidský leukocytární antigen (z angl. human leukocyte antigen)   |
| IFN    | interferon  |
| IgA/G  | imunoglobulin A/G   |
| IL     | interleukin   |
| IRF    | faktor regulující interferon  |
| LPS    | lipopolysacharid  |
| LRR    | repetice bohaté na leucin (z angl. leucine-rich repeats)  |
| MAPK   | mitogenem aktivovaná proteinkináza  |

|           |   |
|-----------|---|
| MDDC      | dendritická buňka derivovaná z monocytu (z angl. monocyte-derived dendritic cells)  |
| MFI       | průměrná fluorescenční intenzita  |
| MHC       | hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility komplex)   |
| MICA      | stresový antigen buněk, ligand receptoru NKG2D (z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A)   |
| MWS       | Muckle-Wells syndrom  |
| NAC       | N-Acetyl-L-cystein  |
| NACHT     | oligomerizační doména vázající nukleotidy   |
| NF-κB     | jaderný faktor-κB (z angl. nuclear factor-κB)   |
| NK        | přirozený zabíječ (z angl. natural killer)  |
| NLR       | NOD-like receptor   |
| NLRC4     | z angl. nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain-containing protein 4   |
| NLRP1/3   | z angl. nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 1/3                                      |
| NOD1/2    | receptorový protein obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotidy (z angl. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2) |
| NOMID     | novorozenecký multisystémový zánětlivý syndrom (z angl. neonatal onset multisystem inflammatory disease)  |
| PAGE      | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu  |
| PAMP      | struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (z angl. pathogen-associated molecular pattern)   |
| PBMC      | mononukleární buňky periferní krve (z angl. peripheral blood mononuclear cell)  |
| PBS       | fosfátový pufovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate buffered saline)  |
| PMSF      | fenylmethylsulfonyl fluorid   |
| polyHEMA  | poly(2-hydroxyethylmethakrylát)   |
| pro-IL-1β | pro-interleukin-1β  |
| PYD       | pyrinová doména   |
| ROS       | reaktivní kyslíkaté intermediáty (z angl. reactive oxygen species)  |
| SDS       | dodecylsulfát sodný   |
| SNP       | jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)  |
| TBS       | Tris pufovaný fyziologický roztok (z angl. Tris buffered saline)  |

|               |  |
|---------------|--|
| TEMED         | N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin   |
| Th            | pomocná T buňka (z angl. T helper cell)  |
| THP-1         | lidská monocytární linie   |
| TIR           | doména společná receptoru TLR a receptoru pro IL-1 (z angl. Toll/IL-1 receptor)  |
| TLR           | receptor skupiny Toll (z angl. Toll-like receptor)                               |
| TMB           | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin  |
| TNF- $\alpha$ | faktor- $\alpha$ nekrotizující nádory (z angl. tumor necrosis factor- $\alpha$ ) |
| TRX           | thioredoxin  |
| TXNIP         | protein interagující s thioredoxinem (z angl. thioredoxin-interacting protein)   |
| WT            | divoká forma (z angl. wild type)   |

## 2 Úvod a cíle práce

Celiakie patří mezi chronická autoimunitní onemocnění postihující tenké střevo. Podstatou celiakie je přemrštěná reakce imunitních buněk jedince na lepek – směs zásobních bílkovin obilných zrn, která v důsledku způsobuje i zánětlivé poškození vlastní tkáně tenkého střeva. Je známo, že výraznou roli v patogenezi tohoto onemocnění sehrávají specifické CD4+ T buňky. Tyto specifické CD4+ T buňky přímo nebo prostřednictvím sekretovaných cytokinů aktivují různé buňky imunitního systému a jejich výkonné mechanismy, které následně způsobují změnu architektury střevní sliznice.

Významnou úlohu v patogenezi celiakie však mají také buňky přirozené imunity. Ty mimo jiné sekrecí cytokinů přispívají k lokálnímu zánětlivému prostředí. Významným prozánětlivým cytokinem buněk přirozené imunity je obecně interleukin (IL)-1 $\beta$  a další členové rodiny IL-1. Bylo ukázáno, že IL-1 $\beta$  se negativně uplatňuje v řadě autoimunitních onemocnění. Jeho zvýšená hladina byla pozorována také v sérech pacientů s celiakií a v kultivačním médiu imunitních buněk izolovaných z krve pacientů s celiakií po *in vitro* stimulaci štěpenými bílkovinami z lepku.

Cíle této diplomové práce byly následující:

- 1) Izolovat a štěpeným gliadinem (monomerní frakce lepku) stimulovat monocyty a mononukleární buňky periferní krve pacientů s neléčenou celiakií a zdravých dárců a následně u nich stanovit produkci IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$
- 2) S využitím mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií a dendritických buněk připravených z prekurzorů z kostní dřeně myši postrádajících vybrané funkční proteiny určit mechanismy a molekuly zapojené v signálních drahách, které řídí expresi, maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  vyvolanou stimulací buněk štěpeným gliadinem

## 3 Literární přehled

### 3.1 Celiakie

Celiakie je chronické zánětlivé onemocnění tenkého střeva. Vzniká u predisponovaných jedinců po požití stravy, která obsahuje lepek. Vlivem imunitní odpovědi u pacientů s nesnášenlivostí lepku dochází k charakteristickým změnám sliznice střeva, tj. atrofii klků, hyperplázii krypt a infiltraci lamina propria zánětlivými buňkami. Následkem těchto patologických změn nemohou být správně vstřebávány živiny a další důležité látky (např. vitamíny a minerály) z potravy. Celiakie patří mezi autoimunitní onemocnění a na jejím vzniku se podílejí vnitřní a vnější faktory. Vnitřními faktory jsou genetické predispozice daného jedince, nezbytným vnějším faktorem je příjem stravy obsahující lepek, ale vliv mají pravděpodobně i další faktory vnějšího prostředí (Di Sabatino and Corazza, 2009).

#### 3.1.1 Klinické symptomy a diagnostika

Odhad výskytu celiakie v evropské populaci se pohybuje v rozmezí 0,3 – 1,2 % (Villanacci *et al.*, 2011). Ačkoli byla celiakie dříve považována za dětské onemocnění, dnes je známo, že může být diagnostikována v jakémkoli věku, a to s dvakrát vyšší pravděpodobností u žen (Villanacci *et al.*, 2011). Vznik u dospělých je spojován se zátěžovými situacemi imunitního systému zahrnujícími infekce, těhotenství a porod či operace (Guandalini and Melin-Rogovin, 2002). Problémem je počet diagnostikovaných pacientů – na jednoho diagnostikovaného pacienta připadá sedm nediagnostikovaných, mnoho potenciálních pacientů tak o své nemoci vůbec neví (van Heel and West, 2006).

Mezi typické symptomy u dětí, u nichž je celiakie diagnostikována do 2 let věku, patří intestinální potíže, jako jsou přetrvávající průjmy, neprospívání, zvracení, zvětšené břicho, úbytek váhy, dále pak ochablé svalstvo či podrážděnost. U dospělých jsou projevy rozmanité a nemusí se jednat o intestinální potíže. Nejčastějšími extraintestinálními příznaky jsou anemie, osteoporóza, menší vzrůst, artritida, epilepsie, neplodnost, poruchy nervového nebo kardiovaskulárního systému, onemocnění jater, zvýšená kazivost zubů, afty, padání vlasů a další. Příčiny velkého počtu a rozmanitosti symptomů nejsou zcela objasněné, pravděpodobně se však jedná o důsledky nutričního deficitu a dysfunkčního imunitního systému. Celiakie však může probíhat také zcela bez příznaků (Guandalini and Melin-Rogovin, 2002; Troncone and Jabri, 2011).

U pacientů s celiakií se navíc ve větší míře objevují jiná (často také autoimunitní) onemocnění. Mezi tato onemocnění patří diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní onemocnění štítné žlázy, Addisonova choroba, Sjögrenův syndrom, deficit imunoglobulinu (Ig) A, primární biliární cirhóza, autoimunitní onemocnění jater, Dermatitis herpetiformis Dühring a některé syndromy, jako je Downův nebo Turnerův syndrom. Riziko vzniku asociovaného autoimunitního onemocnění se zvyšuje, pokud celiakie není diagnostikována včas a organismus je vystavován lepku po delší dobu (Barton and Murray, 2008; Guandalini and Melin-Rogovin, 2002; Ventura *et al.*, 1999).

Prvním krokem při diagnostikování celiakie je stanovení protilátek v krvi. Jedná se o protilátky třídy IgA (popř. IgG) proti tkáňové transglutamináze, endomysiu a případně gliadinu. Druhý krok je založen na odběru tkáně ze střední a distální části duodena perorální endoskopickou sondou. Na bioptickém materiálu se následně histologickým rozbořem dokazuje přítomnost charakteristických lézí. Stupeň poškození se udává v Marsh-Oberhuberových stupních (Marsh, 1990; Oberhuber *et al.* 1999). Jako potvrzení diagnózy potom slouží pozitivní odezva na zavedení bezlepkové diety, která se projevuje zmírněním obtíží, snížením množství specifických protilátek v krvi a zahojením střevní sliznice. U vysoce rizikových jedinců se pro vyloučení celiakie a omezení následných testů dá využít stanovení predispozičních alel genetickými testy (Di Sabatino and Corazza, 2009).

### **3.1.2 Léčba**

Jedinou používanou léčbou celiakie v dnešní době je striktní dodržování celoživotní bezlepkové diety. Pacienti s celiakií nesmějí konzumovat žádné jídlo ani léky s obsahem lepku nebo jeho derivátů, protože i malá množství pro ně mohou být nebezpečná. Velká variabilita mezi jednotlivými pacienty znemožňuje určení přesného a jednotného množství lepku, které by bylo pro pacienty vhodné. Obecně se udává 10 mg lepku na den jako tolerované množství a 50 mg jako nebezpečné (Di Sabatino and Corazza, 2009).

Vyloučení lepku z přijímané stravy je podstatné nejen pro zlepšení histologického nálezu a zmírnění klinických obtíží, ale také zajišťuje prevenci před komplikacemi, které se mohou vyvinout především u dospělých pacientů. Mezi tyto komplikace patří: lymfomy, ulcerózní jejunoileitida, kolagenní sprue nebo nejčastěji refrakterní sprue (která se projevuje neodpovídavostí na zavedenou dietu). Nebezpečí, které tyto komplikace představují, je další poškození tkáně střeva (v tomto případě již nezávisle na

přítomnosti lepku), jež způsobuje přetrvávání a zhoršování klinických obtíží, a v důsledku může vést až ke vzniku rakoviny (Di Sabatino and Corazza, 2009; Villanacci *et al.*, 2011).

Po třech letech dodržování striktní bezlepkové diety naopak riziko vzniku nádorů u pacientů s celiakií klesá, a dokonce je nižší než u zdravé populace. Výjimku tvoří pacienti diagnostikovaní po šesté dekádě životě, u kterých i přes dodržování bezlepkové diety zůstává pravděpodobnost vzniku rakoviny vysoká (Silano *et al.*, 2008).

Kromě bezlepkové diety se v poslední době, vzhledem k alespoň částečnému poznání mechanismů patogeneze celiakie, objevují možnosti alternativní terapie. Tyto možnosti představuje např. blokování jednotlivých kroků, které se podílejí na aktivaci imunitního systému lepkem, selektivní odstranění buněčných populací hrajících negativní roli v patogenezi celiakie, šlechtění obilnin tak, aby obsahovaly menší množství imunodominantních lepkových peptidů nebo orální enzymová terapie a mnohé další (Kagnoff, 2007).

### **3.1.3 Příčiny vzniku celiakie**

#### **3.1.3.1 Genetické predispozice**

Predispozice k tomuto onemocnění jsou dané do značné míry geneticky. Shoda ve výskytu celiakie u jednovaječných dvojčat se pohybuje okolo 85 % (Nisticò *et al.*, 2006). Výsledky genetických studií prokázaly silnou asociaci s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu 2. třídy (MHC, z angl. major histocompatibility complex), a to konkrétně s molekulami HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (z angl. human leukocyte antigen-DQ2/DQ8). Téměř všichni pacienti exprimují jednu z těchto dvou molekul. Přibližně v 90 % případů je to molekula HLA-DQ2, zbylí pacienti mají na povrchu buněk molekulu HLA-DQ8 (Sollid *et al.*, 1989).

Molekula HLA-DQ2 se ale také vyskytuje u 30–40 % zdravé populace. Navíc byl zjištěn výrazně nižší výskyt celiakie u sourozenců, kteří exprimují identické molekuly HLA, než mezi jednovaječnými dvojčaty. Obě tyto skutečnosti ukazují na pravděpodobné zapojení dalších genů, které přispívají ke vzniku celiakie (Nisticò *et al.*, 2006).

Pro odhalení těchto tzv. non HLA genů byly provedeny rozsáhlé celogenomové studie, které hledají chromozomální oblasti (lokusy) asociované s příslušným onemocněním (Heap and van Heel, 2009; van Heel *et al.*, 2007). Pomocí celogenomových studií bylo odhaleno celkem 26 lokusů asociovaných s celiakií, rozšíření jejich počtu na 39 přineslo využití tzv. imunočipů (Trynka *et al.*, 2011). A ačkoli bylo do

roku 2012 nalezeno hned několik kandidátních genů nacházejících se v daných lokusech, zdá se, že jejich celkový příspěvek k dědičnému výskytu celiakie je velmi malý. Příkladem jsou geny pro CTLA-4 (regulační protein imunitního systému), interleukin (IL)-21, IL-2, c-REL (podjednotka komplexu jaderného faktoru- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) a další (Kumar *et al.*, 2012).

Celkem bylo dosud vysvětleno přibližně 54 % z genetického vlivu, které se podílejí na citlivosti jedinců ke vzniku celiakie. Největší podíl na dědičnosti celiakie mají geny pro molekuly HLA (okolo 40 %), zbylých 60 % je rozděleno mezi dosud neznámý počet non HLA genů, z nichž každý pravděpodobně přispívá pouze menší měrou a z kterých bylo dodnes určeno jen malé množství objasňující asi 14 % genetických predispozic (Trynka *et al.*, 2011).

### 3.1.3.2 Lepek

Klíčovým faktorem vyvolávajícím celiakii je lepek, což dokládá skutečnost, že po zavedení bezlepkové diety u většiny pacientů dochází k remisi onemocnění. Lepek neboli gluten je směs bílkovin obsažená v obilných zrnech pšenice. Podle rozpustnosti ve vodném roztoku alkoholu se tato směs dělí na rozpustné gliadiny a nerozpustné gluteniny. Zatímco gliadiny jsou monomery obsahující 250–300 aminokyselin (AK), gluteniny jsou polymerní struktury. Na základě aminokyselinové sekvence gliadiny rozdělujeme na  $\alpha$ -,  $\gamma$ - a  $\omega$ -gliadiny, přičemž všechny tyto komponenty mohou vyvolat poškození střevní sliznice. Gluteniny rozdělujeme do dvou skupin dle molekulové hmotnosti na nízkomolekulární (270–330 AK) a vysokomolekulární (650–800 AK), u kterých byly také pozorovány toxické a imunogenní účinky (Di Sabatino and Corazza, 2009; Sollid, 2002).

Zásobní bílkoviny s podobným aminokyselinovým složením jako mají pšeničné gliadiny, byly nalezeny také u ječmene a žita. Stejně jako pšeničné gliadiny vyvolávají i zásobní bílkoviny ječmene a žita u vnímavých jedinců imunitní odpověď (Di Sabatino and Corazza, 2009).

Bílkoviny obsažené v lepku, zejména pak gliadiny, mají dvě vlastnosti, které by mohly vysvětlovat jejich schopnost vyvolávat imunitní reakci. Zaprvé obsahují ve velké míře aminokyselinu prolin, díky které jsou tyto bílkoviny více odolné vůči degradaci střevními proteázami. V lumen střeva tak nedochází k jejich úplnému rozštěpení, ale nacházejí se zde jako fragmenty o délce 10–50 AK. Prolin navíc ovlivňuje strukturu fragmentů, které se následně snadněji váží na molekuly HLA-DQ2 asociované s celiakií (Sollid, 2002). Zadruhé typicky obsahují ve větším zastoupení také aminokyselinu



glutamin, která je substrátem pro enzym tkáňovou transglutaminázu. Tkáňová transglutamináza přeměňuje některé glutaminy na glutamáty, a tak zvyšuje imunogenicitu gliadinových fragmentů. Tyto fragmenty se totiž díky vzniklému zápornému náboji na glutamátu lépe váží na molekuly HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (které jsou zmíněny výše jako důležité molekuly asociované s celiakií), což následně vede k aktivaci specifických T buněk (Jabri and Sollid, 2009).

Gliadinové peptidy obsahují mnoho různých epitopů, které jsou rozeznávány buňkami imunitního systému. Zejména významnými se pak zdají být ty epitopy, které se nacházejí na  $\alpha$  gliadinech, protože bylo prokázáno, že jsou rozeznávány T buňkami většiny celiaků (Arentz-Hansen *et al.*, 2000). Důležitým fragmentem  $\alpha$  gliadinu je 33-mer (56. – 88. AK  $\alpha 2$  gliadinu). 13 z jeho celkových 33 AK tvoří prolin, tudíž je velmi odolný vůči štěpení proteázami. Navíc obsahuje dohromady 6 částečně se překrývajících HLA-DQ2 vazebných epitopů rozeznávaných T buňkami, což z něj činí velmi účinný aktivátor T buněk (Qiao *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2002). Naopak mezi gliadinové peptidy, které neaktivují T buňky, ale mechanismy přirozené imunity, patří peptidy p31-43, p31-49 a p31-55 (vzniklé štěpením  $\alpha$  gliadinu). p31-43 a p31-49 indukuje u enterocytů a mononukleárních buněk lamina propria expresi maturačních znaků, stresových molekul a IL-15, důležitého cytokinu přirozené imunity (Hüe *et al.* 2004; Maiuri *et al.*, 2003; Mamone *et al.*, 2007).

### 3.1.3.3 Kofaktory vnějšího prostředí

Pokud se celiakie manifestuje u velmi malých dětí (typicky starých několik měsíců), často se tak děje velmi brzy poté, co jsou do jejich stravy zařazeny obilné produkty. Pokud se celiakie projeví až u starších dětí a dospělých, předpokládá se, že jejich genetické predispozice jsou nastaveny tak, aby imunitní systém sice rozeznal proteiny lepku a reagoval na ně jako na potenciálně nebezpečné antigeny, ale je potřeba dalších podnětů (kromě přítomnosti lepku ve stravě), které vedou ke ztrátě orální tolerance lepku a vzniku celiakie (Guandalini and Melin-Rogovin, 2002).

Jako tyto kofaktory vnějšího prostředí jsou uvažovány střevní infekce, které mohou jednak zvyšovat propustnost střevní bariéry, a tedy usnadňovat vstup gliadinových fragmentů do lamina propria, a jednak vést k vyšší expresi tkáňové transglutaminázy (v této souvislosti jsou často uváděny zejména rotavirové infekce) (Stene *et al.*, 2006). Dále se jedná o způsob zařazení lepku do stravy dítěte, vliv má nejen načasování, ale i množství lepku a zda je dítě kojeno. V neposlední řadě by roli mohlo hrát i složení střevní

mikroflóry, stresové situace, jako těhotenství, porod nebo operace a celkové množství konzumovaného lepku, jeho kvalita a zpracování (Lionetti and Catassi, 2011).

## **3.2 Patogeneze celiakie**

### **3.2.1 Štěpení lepku v trávicím traktu**

Všechny bílkoviny, včetně lepku, vstupující do trávicí soustavy podléhají štěpení. První fáze štěpení se odehrává v žaludku účinkem pepsinu. Následuje štěpení na oligopeptidy pankreatickými proteázami a karboxypeptidázami v dvanácterníku. Vzniklé oligopeptidy jsou poté štěpeny na jednotlivé aminokyseliny nebo di- a tripeptidy membránově vázanými peptidázami kartáčového lemu buněk střevního epitelu. Malé peptidové fragmenty a jednotlivé aminokyseliny procházejí skrz epitel do lamina propria a dále do krve (Erickson and Kim, 1990).

Gliadinové peptidy ale díky vysokému obsahu prolinu odolávají účinkům mnoha proteáz a peptidáz, a zůstávají tak v lumen střeva ve formě oligopeptidů, které jsou následně schopné aktivovat přirozené i adaptivní mechanismy imunity (Ciccocioppo *et al.*, 2005; Hausch *et al.*, 2002).

### **3.2.2 Prostupování gliadinových peptidů střevní bariérou**

Aby se gliadinové peptidy mohly setkat s buňkami imunitního systému, které jsou zodpovědné za patogenezi celiakie, musí tyto peptidy prostupovat skrze střevní bariéru. Přesné mechanismy průniku gliadinových fragmentů nejsou známy, prozatím byly popsány následující dráhy.

Jednou z nich je paracelulární cesta závislá na proteinu zonulinu, který zvyšuje propustnost těsných spojů. Bylo ukázáno, že gliadin zvyšuje expresi a sekreci zonulinu z enterocytů, což způsobuje zvýšenou propustnost epiteliální střevní bariéry pro makromolekuly z lumen střeva do lamina propria (Clemente *et al.*, 2003).

Jinou možností představuje transcytóza gliadinu z apikální na bazální stranu skrze jednotlivé buňky střevního epitelu. Translokace gliadinu tímto způsobem se ještě zvyšuje při lokálním působení interferonu (IFN)- $\gamma$  a probíhá ve větší míře u neléčených pacientů s celiakií než u zdravých jedinců (Schumann *et al.*, 2008).

Další navrženou dráhu představuje retro-transcytóza komplexu sekrečního IgA a gliadinu za účasti receptoru CD71 (Matysiak-Budnik *et al.*, 2008).

### 3.2.3 Posttranslační úpravy gliadinových peptidů

Poté, co se gliadinové fragmenty dostanou do lamina propria, může dojít k jejich posttranslačním úpravám. Ty způsobuje cytozolický enzym tkáňová transglutamináza, proti kterému se u celiaků tvoří autoprotilátky (Dieterich *et al.*, 1997).

Tkáňová transglutamináza jednak způsobuje deaminaci glutaminu v gliadinových peptidech na glutamát (viz výše), a jednak může docházet přímo k jejímu provazování s gliadinem, čímž vzniká komplex gliadin-tkáňová transglutamináza. Oba tyto děje vedou k vzniku nových epitopů a zvyšují stimulační účinek gliadinu na buňky imunitního systému (Reif and Lerner, 2004).

Předpokládá se, že specifická buněčná imunitní odpověď je namířena nejprve proti gliadinovým peptidům, které nebyly posttranslačně upraveny. V jejím důsledku vzniká lokální zánět a poškození střeva, což způsobuje zvýšenou sekreci tkáňové transglutaminázy ven z buněk (mononukleární buňky lamina propria a mezenchymální buňky), a dochází tak k výraznému zesílení celého procesu (Jabri and Sollid, 2009).

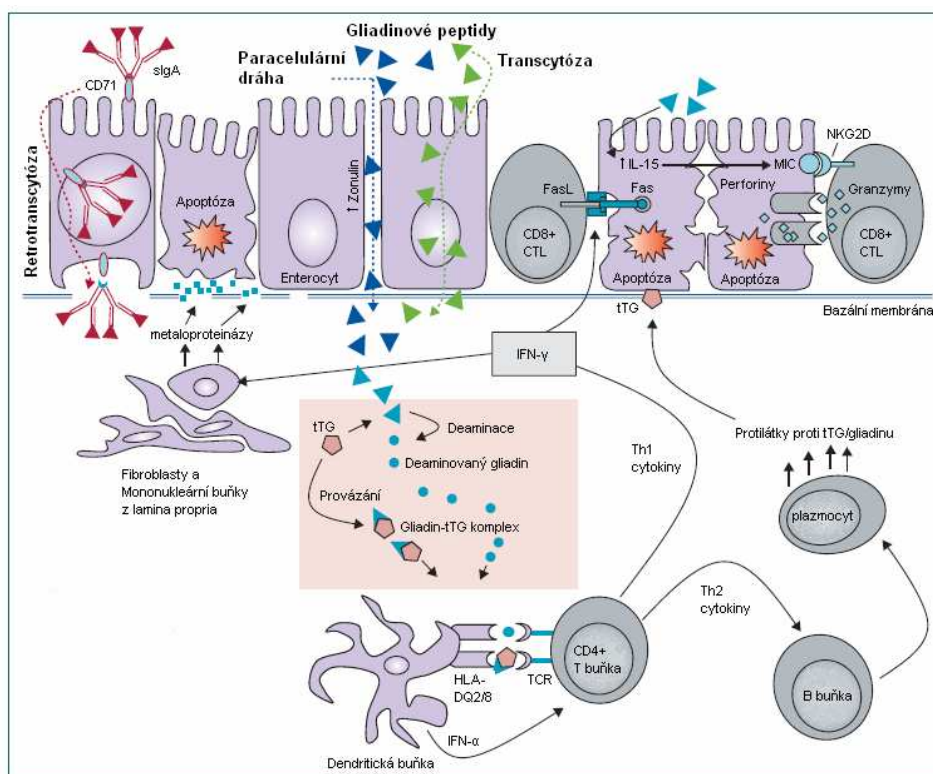
### 3.2.4 Imunitní odpověď na gliadin zprostředkovaná T buňkami

Gliadinové peptidy jsou v lamina propria vystavovány na povrchu antigen prezentujících buněk (APC) okolním T buňkám. Rozeznání gliadinových peptidů v komplexu s molekulami HLA (zejména HLA-DQ2 a HLA-DQ8) vede k aktivaci gliadin specifických CD4<sup>+</sup> T buněk (Halstensen *et al.*, 1993). Tyto gliadin specifické CD4<sup>+</sup> T buňky byly izolovány pouze ze střevního bioptátu pacientů s celiakií, nikoli ze střevního bioptátu zdravých dárců (Molberg *et al.*, 1997). Polarizace CD4<sup>+</sup> T buněk směrem k Th1 (z angl. T helper cell) se děje nejspíše účinkem lokálního cytokinového prostředí IFN- $\alpha$ , IL-18 a IL-21 (Fina *et al.*, 2008; Monteleone *et al.*, 2001; Salvati *et al.*, 2002). Aktivované gliadin specifické CD4<sup>+</sup> Th1 buňky následně sekretují IFN- $\gamma$  a další cytokiny, které se podílejí na aktivaci dalších buněk a jejich efektorových mechanismů zodpovědných za poškození extracelulární matrix, atrofii klků a zničení epiteliálních buněk (Deem *et al.*, 1991; Nilsen *et al.*, 1998; Pender *et al.* 1997).

Mezi hlavní mechanismy odpovědné za poškození střevního epitelu patří aktivace intraepiteliálních cytotoxických CD8<sup>+</sup> T buněk (CTL, z angl. cytotoxic T lymphocyte). K aktivaci CTL dochází účinkem IFN- $\gamma$  a IL-21 (sekretované Th1 buňkami) a IL-15, který po stimulaci gliadinem sekretují střevní epiteliální buňky i APC (Kasaian *et al.*, 2002; Mention *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2001). CTL celiaků navíc vykazují oproti CTL zdravých jedinců zvýšenou expresi aktivačních receptorů NKG2D a CD94-NKG2C a

naopak téměř postrádají inhibiční receptor CD94-NKG2A. Účinkem gliadinu je kromě exprese aktivačních receptorů zvýšena i exprese jejich ligandů, molekul MICA (z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A), na povrchu střevních epitelálních buněk. Interakce mezi aktivačními receptory na CTL a jejich ligandy vede k aktivaci výkonných mechanismů CTL a masivnímu odumírání epitelálních buněk (Hüe *et al.*, 2004; Jabri and Sollid, 2009; Meresse *et al.*, 2004; Meresse *et al.*, 2006).

CD4<sup>+</sup> Th2 buňky navíc pomáhají aktivovat B buňky a diferencovat je v plasmocyty sekretující specifické protilátky třídy IgA a IgG. Tyto protilátky následně mohou přispívat k transportu gliadinových peptidů z lumen do lamina propria, a celou imunitní reakci tak zesilovat (Matysiak-Budnik *et al.*, 2008). Mechanismy patogeneze celiakie jsou shrnuty na obr. 1.



**Obr. 1: Mechanismy patogeneze celiakie.** Gliadinové peptidy procházejí skrz střevní epitel mechanismem transcytózy, paracelulární cestou podpořenou zvýšeným uvolňováním zonulinu nebo retro-transcytózou pomocí sekrečního IgA (sIgA) a receptoru CD71. Deaminace a provazování gliadinu s tkáňovou transglutaminázou (tTG) podporuje vystavování gliadinových fragmentů ve spojení s molekulami HLA (především HLA-DQ2 a HLA-DQ8) na povrchu APC. Dendritické buňky sekretují IFN- $\alpha$ , který pomáhá aktivovat T buňky. Aktivované gliadin specifické CD4<sup>+</sup> T buňky produkují řadu zánětlivých cytokinů. Významný Th1 cytokin je zejména IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  a další cytokiny následně aktivují u fibroblastů a mononukleárních buněk lamina propria sekreci metaloproteináz, jež jsou zodpovědné za poškození extracelulární matrix a bazální membrány. Th1 cytokiny a IL-15 také aktivují cytotoxické intraepiteliální

CD8+ T buňky (CTL), které jsou zodpovědné za ničení enterocytů, a to mechanismem založeným na interakci Fas-FasL nebo na interakci MIC-NKG2D a účinkem perforinů a granzymů. Cytokiny produkované CD4+ Th2 buňkami podporují diferenciaci B buněk na plasmocyty sekretující protilátky proti gliadinu a tTG. Vazba protilátek proti tTG na membránově vázanou tTG může vést ke vzniku depozit, které také podporují zničení enterocytů. Převzato a upraveno z Di Sabatino and Corazza, 2009.

### **3.3 Mechanismy přirozené imunity v patogenezi celiakie**

Ačkoli T buňky hrají v patogenezi celiakie klíčovou roli, v poslední době přibývá studií, které se zabývají mechanismy přirozené imunitní odpovědi na gliadin. Některé gliadinové peptidy totiž nejsou rozeznávány T buňkami a vyvolávají poškození střevní sliznice bez účasti aktivovaných gliadin specifických T buněk. Významné postavení v mechanismech přirozené imunitní odpovědi na gliadin by mohly mít zejména střevní epiteliální buňky a APC, které by mohly stát na počátku celého procesu patogeneze (Stepniak and Koning, 2006).

#### **3.3.1 Účinky gliadinu na střevní epiteliální buňky**

Jsou-li střevní epiteliální buňky pacientů s celiakií vystaveny gliadinu, dochází u nich k expresi a sekreci celé řady molekul, jež se následně podílejí na aktivaci imunitního systému.

Bylo ukázáno, že po stimulaci gliadinem dochází u střevních epiteliálních buněk pacientů s celiakií ve větší míře k apoptóze. Stimulace gliadinem společně s IL-15 u enterocytů vyvolává vyšší expresi stresových proteinů MICA, strukturně podobných MHC molekulám 1. třídy. Jak už bylo zmíněno výše, molekuly MICA jsou rozpoznávány receptory na povrchu CTL, což v důsledku vede k apoptóze enterocytů (Hüe *et al.*, 2004; Maiuri *et al.*, 2003; Terrazzano *et al.*, 2007).

Dále bylo ukázáno, že vazba gliadinu na chemokinový receptor CXCR3 způsobuje zvýšené uvolňování zonulinu ze střevních epiteliálních buněk, což má za následek zvýšenou propustnost střevní bariéry (Lammers *et al.*, 2008). Gliadin také u epiteliálních buněk indukuje expresi tkáňové transglutaminázy a v neposlední řadě akumulace gliadinových peptidů v lysozomech enterocytů vyvolává zvýšenou hladinu reaktivních kyslíkatých intermediátů (ROS, z angl. reactive oxygen species) v těchto buňkách (Luciani *et al.*, 2010; Silano *et al.*, 2005).

### 3.3.2 Účinky gliadinu na antigen prezentující buňky a molekulární mechanismy jejich aktivace

Důležitou roli v patogenezi celiakie hrají APC, jež na svém povrchu vystavují gliadinové peptidy v komplexu s molekulami HLA. Bylo ukázáno, že u neléčených celiaků se v lamina propria nachází několikrát více dendritických buněk než u léčených pacientů a zdravých dárců (Di Sabatino *et al.*, 2007; Ráki *et al.*, 2006). Dále je velmi podstatné, že buňky přirozené imunity (společně s dalšími střevními buňkami) sekretují po působení gliadinu velké množství cytokinů, vytvářejí tak charakteristické cytokinové prostředí, které pomáhá aktivovat a diferencovat buňky adaptivní imunity (Garrote *et al.*, 2008).

Existuje několik studií popisujících účinky gliadinu na APC. Stimulace makrofágů gliadinem vede k jejich aktivaci. Na rozdíl od jiných potravinových antigenů vyvolává gliadin společně s IFN- $\gamma$  u makrofágů zvýšenou produkci oxidu dusnatého, sekreci TNF- $\alpha$  (z angl. tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-10 a chemokinů RANTES (Tučková *et al.*, 2002). Další studie potvrdily, že po stimulaci makrofágů gliadinem dochází k expresi genů kódujících proteiny účastnící se zánětlivé imunitní odpovědi, sekreci cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-15) a navíc zonulinu, molekuly zvyšující střevní propustnost (Thomas *et al.*, 2006).

Stimulace buněk linie THP-1 (lidská monocytární linie) gliadinem způsobuje taktéž jejich aktivaci. Gliadin stimuluje produkci TNF- $\alpha$  a IL-8, která se zvyšuje, pokud se spolu s gliadinem k buňkám přidá IFN- $\gamma$  (Jelínková *et al.*, 2004). Shodný vliv má gliadin i na monocyty izolované z periferní krve neléčených celiaků. Ty po stimulaci gliadinem produkují vyšší množství TNF- $\alpha$  a IL-8 v porovnání s monocyty izolovanými z krve léčených celiaků a zdravých dárců, stejně tak u nich dochází k vyšší expresi povrchových maturationálních znaků, jako jsou CD83, CD80, CD86 a CD40 (Cinová *et al.*, 2007). Dále byla u monocytů a mononukleárních buněk periferní krve (PBMC, z angl. peripheral blood mononuclear cell) neléčených celiaků po stimulaci gliadinem pozorována také zvýšená sekrece IL-1 $\beta$  a IL-23 (Harris *et al.*, 2008).

Působení gliadinu vede k aktivaci dendritických buněk (DC). U dendritických buněk derivovaných z monocytů (MDDC, z angl. monocyte-derived dendritic cells) stimulace gliadinem vyvolává zvýšenou expresi povrchových znaků (CD83, CD80, CD86 a HLA-DR), snižuje jejich fagocytickou aktivitu a zvyšuje sekreci IL-8 i dalších chemokinů a také prozánětlivých cytokinů (IL-6 a TNF- $\alpha$ ). MDDC stimulované

gliadinem navíc vykazují lepší schopnost aktivovat T buňky a mají vyšší migrační schopnost (Chládková *et al.*, 2011; Palová-Jelínková *et al.*, 2005). Bylo ukázáno, že exprese aktivačních povrchových molekul a sekrece cytokinů u MDDC není ovlivněna genetickým pozadím a dosahuje stejných hodnot u celiaků, celiaků dodržujících bezlepkovou dietu i zdravých dárců nesoucích molekulu HLA-DQ2 a zdravých dárců, kteří nenesou ani molekulu HLA-DQ2 ani HLA-DQ8 (Rakhimová *et al.*, 2009).

Podobné účinky gliadinu byly ukázány také u myších dendritických buněk derivovaných z prekurzorů z kostní dřeně (BMDC, z angl. bone marrow-derived dendritic cell). BMDC stimulované gliadinem vykazují zvýšené množství MHC molekul 2. třídy, kostimulačních molekul, sekretovaných cytokinů a chemokinů (Nikulina *et al.*, 2004).

Předchozí studie také odhalily některé z molekulárních mechanismů aktivace APC. Bylo ukázáno, že v signálních drahách spuštěných gliadinem, jež v důsledku vedou k aktivaci monocytů, PBMC a DC, hrají roli transkripční faktor NF- $\kappa$ B a protein p38 z rodiny MAPK (z angl. mitogen-activated protein kinase). Naopak role dalšího člena rodiny MAPK, ERK1/2, se nepotvrdila (Cinová *et al.*, 2007; Chládková *et al.*, 2011; Jelínková *et al.*, 2004; Palová-Jelínková *et al.*, 2005). Studie na makrofázích objevily účast molekuly MyD88 v aktivaci buněk gliadinem. Ačkoli je MyD88 jedna z důležitých adaptorových molekul zajišťujících signalizaci mezi povrchovými receptory TLR (z angl. Toll-like receptor) či IL-1R (receptor pro IL-1) a transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B, nebyla potvrzena role TLR2 ani TLR4 jako receptorů pro gliadin (Thomas *et al.*, 2006). Přesto byl v jiné studii u APC jako gliadinový receptor navržen právě TLR4 (Junker *et al.*, 2009).

### **3.4 Interleukin-1 $\beta$ a další členové rodiny interleukinu-1**

Interleukin-1 $\beta$  je jedním z jedenácti členů rodiny IL-1. Ta kromě IL-1 $\beta$  ještě zahrnuje např. IL-1 $\alpha$ , IL-18, IL-33, IL-36. Nejvíce studované jsou první dva objevené interleukiny z této rodiny, IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , jež se díky svým významným prozánětlivým účinkům uplatňují v obraně organismu před infekcí (Dinarello, 2011).

IL-1 $\beta$  je produkován zejména monocyty, makrofágy a DC a vyznačuje se rozmanitými účinky na buňky imunitního systému. Indukuje u nich produkci chemokinů, jiných cytokinů, oxidu dusnatého, aktivuje lymfocyty a jiné. Účinkuje však nejen na buňky imunitního systému, např. jeho působení na endoteliální buňky u nich

vyvolává zvýšenou expresi povrchových adhezivních molekul, dále zapříčiňuje syntézu proteinů akutní fáze v jaterních buňkách a také funguje jako pyrogen (Dinarello, 1996).

IL-1 $\alpha$  produkují různé imunitní i neimunitní buňky (epiteliální a endoteliální buňky, fibroblasty i další) a má podobné prozánětlivé účinky jako IL-1 $\beta$ . Na rozdíl od IL-1 $\beta$  je však exprimován konstitutivně a prekurzor (neštěpená forma IL-1 $\alpha$ ) je biologicky aktivní. IL-1 $\alpha$  patří mezi cytokiny s duální funkcí. To znamená, že prekurzor IL-1 $\alpha$  může být translokován do jádra buněk, kde funguje jako transkripční faktor a reguluje transkripci genů, zároveň však může být IL-1 $\alpha$  z buněk sekretován a sloužit jako mediátor lokálního zánětu (Dinarello, 1996; Stylianou and Saklatvala, 1998).

Dalším členem rodiny IL-1 je IL-18. IL-18 byl objeven jako faktor indukující produkci IFN- $\gamma$ , jeho účinky jsou však mnohem rozmanitější a v mnohém se podobají účinkům IL-1. U buněk imunitního systému např. vyvolává produkci chemokinů a cytokinů, podporuje polarizaci T buněk směrem k Th1, aktivuje NK buňky (z angl. natural killer). U neimunitních buněk např. zvyšuje expresi adhezivních molekul. Zdrojem IL-18 jsou především monocyty, makrofágy a keratinocyty (Dinarello, 1999).

### **3.4.1 Signální dráhy řídicí expresi pro-interleukinu-1 $\beta$**

Protože IL-1 $\beta$  je důležitý cytokin regulující zánět, jeho buněčná produkce je přísně kontrolována a pro syntézu a sekreci aktivní podoby IL-1 $\beta$  je vyžadováno několik signálů.

První z nich je nutný k expresi genu pro IL-1 $\beta$ . Jedná se o téměř všechny testované mikrobiální produkty. Transkripci genu pro IL-1 $\beta$  vyvolává i řada nemikrobiálních podnětů (cytokiny, oxid křemičitý, azbest, C-reaktivní protein, stresové faktory jako UV záření a mnohé další), ne všechny jsou ale dostatečné i pro následnou translaci, např.  $\gamma$  záření, kyselina retinová nebo složky komplementu, jako C5a či faktor H, vedou pouze k zvýšené hladině mRNA pro IL-1 $\beta$  v buňce (Dinarello, 1996).

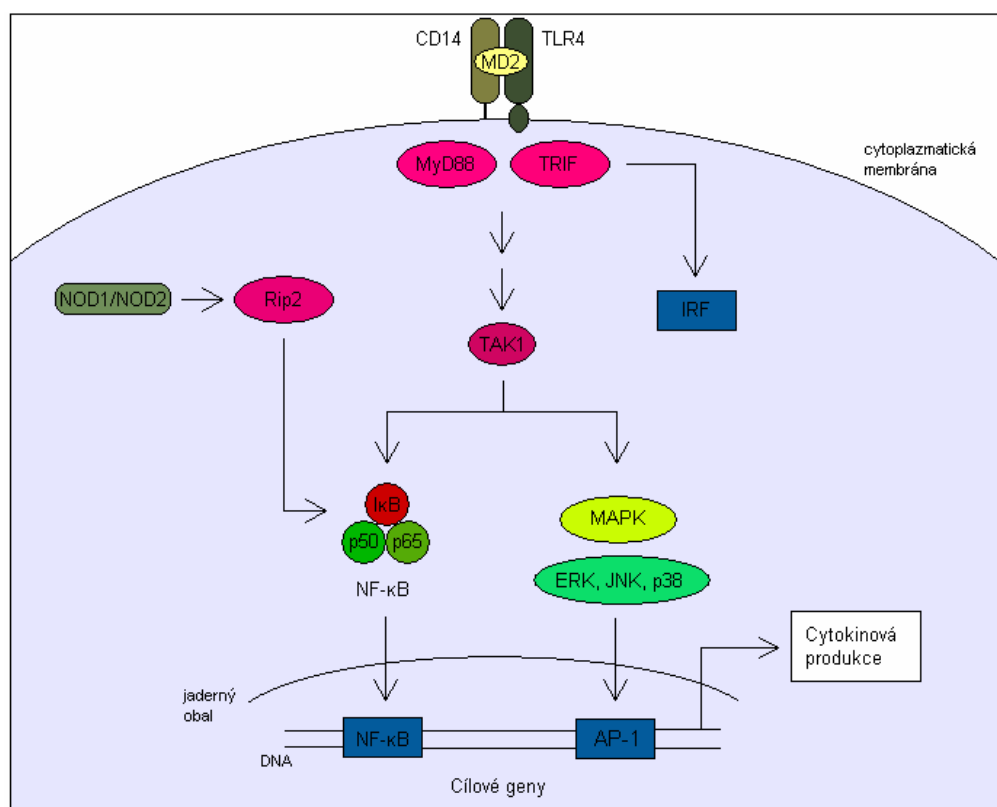
Bylo ukázáno, že jako receptory, které stojí na počátku signálních drah řídicích expresi genu pro IL-1 $\beta$ , slouží receptory TLR, NOD1 a NOD2 (z angl., nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2).

TLR jsou transmembránové receptory, které pomocí extracelulární části bohaté na aminokyselinu leucin, LRR (z angl. leucine-rich repeats), rozeznávají struktury charakteristické pro patogeny (PAMP, z angl. pathogen-associated molecular pattern). Cytozolická část receptoru TLR obsahuje doménu TIR (Toll/IL-1 receptor), která váže adaptorové proteiny. Těmito adaptorovými proteiny mohou být MyD88, TRIF, TRAM a Mal neboli TIRAP. Adaptorové proteiny dále váží a aktivují další molekuly signálních



drah, např. kinázy z rodiny MAPK. Na konci signální dráhy, jež zahrnuje adaptorové proteiny MyD88 a TRIF, jsou transkripční faktory NF- $\kappa$ B a AP-1 (aktivační protein 1). Tyto faktory zahajují transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny včetně IL-1 $\beta$ . V případě dráhy obsahující pouze adaptor TRIF mohou být transkripčními faktory také IRF (faktory regulující interferon), ty řídí transkripci interferonů typu 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006).

Cytoplazmatické receptory NOD1 a NOD2 také obsahují část LRR, která rozeznává signály DAMP (z angl. danger-associated molecular pattern). Jako doména vázající adaptory slouží doména CARD (z angl. caspase recruitment domain), přes kterou se váže serin/threoninová kináza RICK (známá také jako RIP2). Aktivace této kinázy dále vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a transkripci genu pro IL-1 $\beta$ . Zatím neznámým mechanismem jsou po aktivaci receptorů NOD aktivovány také kinázy z rodiny MAPK (Uematsu and Fujimoto, 2010). Signální dráhy receptoru TLR4, NOD1 a NOD2 jsou shrnuty na obr. 2.



**Obr. 2: Signalizace přes receptory TLR4, NOD1 a NOD2.** Po vazbě ligandu (např. lipopolysacharidu) na receptor TLR4 (v komplexu s proteiny CD14 a MD2) je zahájena buď signalizace zahrnující adaptorové molekuly MyD88 a TRIF, protein TAK1, členy rodiny MAPK (ERK, JNK, a p38) a transkripční faktory NF- $\kappa$ B a AP1, nebo signalizace zahrnující adaptorovou molekulu TRIF a transkripční faktor IRF. Po vazbě ligandu na receptor NOD1 nebo NOD2 je aktivována dráha zahrnující kinázu Rip2 a transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Vazba transkripčních faktorů na DNA v důsledku vede k produkci cytokinů. Podle Li *et al.*, 2012.

### 3.4.2 Maturace pro-interleukinu-1 $\beta$

Po úspěšné transkripci a translaci se IL-1 $\beta$  v buňce nachází ve formě prekurzoru, pro-interleukinu-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ). Tato forma IL-1 $\beta$  ještě není aktivní a musí být dále maturována. Maturace zahrnuje štěpení prekurzoru o hmotnosti 31 kDa na 17 kDa aktivní formu, která je sekretována z buňky. Maturace pro-IL-1 $\beta$  se děje dvěma mechanismy. První z nich je mechanismus závislý na kaspáze-1, druhý je nezávislý na kaspáze-1.

#### 3.4.2.1 Štěpení pro-interleukinu-1 $\beta$ kaspázou-1

Kaspáza-1 spolu s ostatními kaspázami patří do rodiny cytoplazmatických proteáz, které štěpí své substráty za aminokyselinou aspartátem. Kaspázy jsou studovány zejména v souvislosti s apoptózou buněk, některé z kaspáz (lidská kaspáza-1, -4, -5 a -12) se ale účastní i štěpení a sekrece prozánětlivých molekul, a bývají proto nazývány prozánětlivé kaspázy (Nadiri *et al.*, 2006).

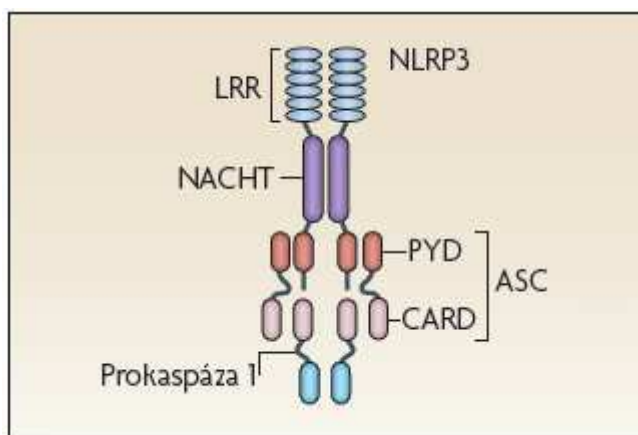
Kaspáza-1 je první objevená kaspáza. Nachází se v cytoplazmě fagocytických buněk ve formě neaktivního zymogenu – prokaspázy-1. Po přiblížení více molekul prokaspáz-1 k sobě se prokaspázy-1 samoštěpí a vytváří aktivní heterodimer složený ze dvou 10 kDa a dvou 20 kDa podjednotek. Funkce aktivní kaspázy-1 zahrnuje i štěpení prekurzoru IL-1 $\beta$  na jeho aktivní formu (Thornberry *et al.*, 1992).

Důležitým krokem v autokatalytické aktivaci kaspázy-1 je vytvoření velkého makromolekulárního komplexu, který se nazývá inflamazóm (hmotnost okolo 700 kDa). Inflamazóm funguje jako lešení, jež váže molekuly prokaspáz-1, vzájemně je přibližuje, a přispívá tak k jejich aktivaci. Nejlépe prozkoumány jsou inflamazómy NLRP1, NLRP3 (nazývaný také NALP3 nebo cryopyrin) (z angl. nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 1/3) a NLRC4 (z angl. nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain-containing protein 4) (Lamkanfi *et al.*, 2007).

Vzhledem k tomu, že se objevily studie, které potvrzují roli NLRP3 v patogenezi některých autoimunitních a autoinflamatorních onemocnění, a v nedávné době také první náznaky jeho možné účasti v patogenezi celiakie, v další části se budu věnovat struktuře a aktivaci právě tohoto typu inflamazómu (Pontillo *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2011).

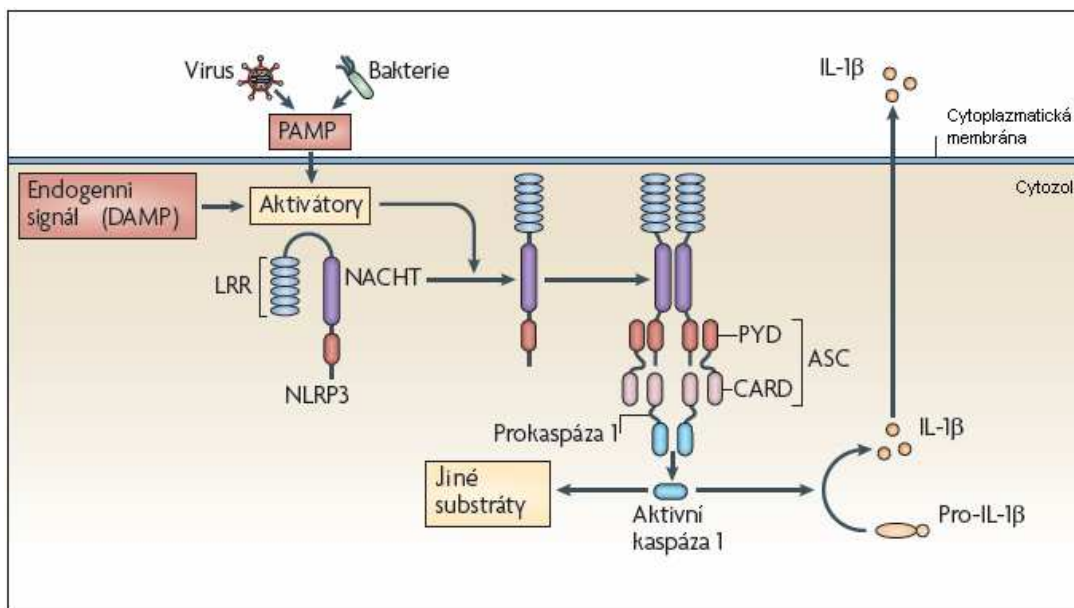
Podstatnou částí inflamazómu NLRP3 je protein NLRP3, receptor z rodiny NLR (z angl. NOD-like receptor). Protein NLRP3 obsahuje tři důležité části. Středovou částí je doména NACHT, přes kterou jsou vytvářeny oligomery a vázány nukleotidy. C-konec je tvořen LRR. Na N-konci se nachází doména obsahující pyrin (PYD). Důležitou

adaptorovou molekulou inflamazómu NLRP3 je protein ASC (z angl. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain – CARD). ASC se jednak váže přes svoji doménu PYD k PYD doméně NLR, a jednak se svojí doménou CARD váže na CARD doménu prokaspázy-1. Protein ASC tedy slouží jako adaptor mezi receptorem NLR a prokaspázou-1 (Pedra *et al.*, 2009), jak je uvedeno na obr. 3.



**Obr. 3: Struktura inflamazómu NLRP3.** Inflamazóm NLRP3 se skládá z receptorového proteinu NLRP3, adaptorového proteinu ASC a prokaspázy-1. Podle Tschopp and Schroder, 2010.

Inflamazóm se v DC a makrofázích vyskytuje v neaktivní formě. Aby tedy mohlo dojít k maturaci pro-IL-1 $\beta$  kaspázou-1, musí buňka obdržet signál, který povede k sestavení inflamazómu. Až po obdržení tohoto signálu proteiny NLRP3 oligomerizují, váží adaptorové proteiny ASC a ty zprostředkují vazbu a aktivaci prokaspázy-1 (obr. 4). Jako signály, jež vedou k sestavení inflamazómu, byly prokázány PAMP bakterií, hub a virů (Craven *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009; Ichinohe *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Martinon *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2010; Rajan *et al.*, 2011). Jednat se ale může i o produkty vlastních buněk organismu spojené s buněčným poškozením nebo stresem (DAMP) a o exogenní látky, jako jsou např. adjuvancia (Eisenbarth *et al.*, 2008; Ghaemi-Oskouie and Shi, 2011; Niemi *et al.*, 2011; Pazár *et al.*, 2011; Rajamäki *et al.*, 2010).



**Obr. 4: Aktivace inflamazómu NLRP3.** V klidových DC nebo makrofázích je inflamazóm neaktivní, tedy jeho jednotlivé proteiny nejsou vázány. Po obdržení signálu PAMP nebo DAMP dochází k seskupení proteinů NLRP3, ASC a prokaspáz-1 do inflamazomového komplexu, což umožňuje autokatalytickou aktivaci kaspázy-1. Aktivní kaspáza-1 štěpí pro-IL-1 $\beta$  na aktivní IL-1 $\beta$ , který je uvolňován z buňky. Převzato a upraveno z Tschopp and Schroder, 2010.

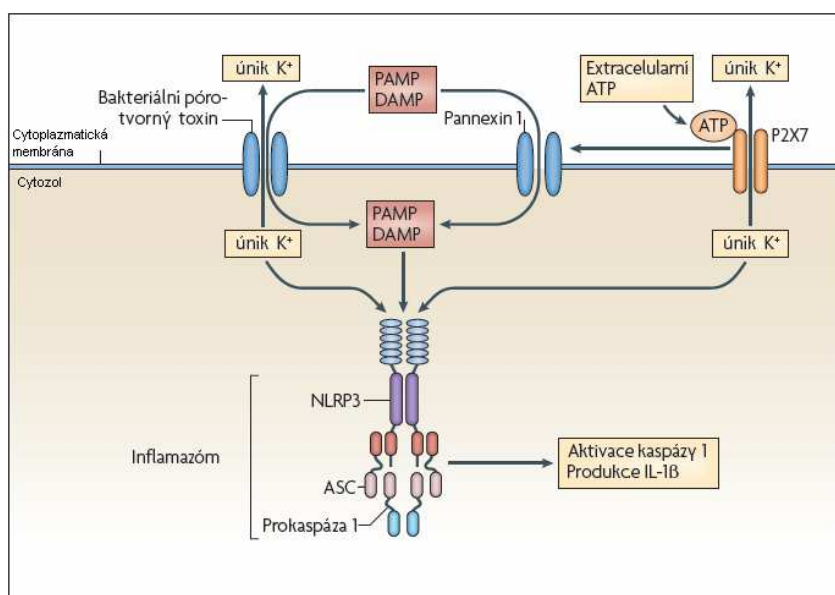
Ačkoli je známo mnoho signálů vedoucích k sestavení inflamazómu, málo se ví o molekulárních mechanismech tohoto děje. Některé látky se sice mohou vázat přímo na LRR oblast, ale nezdá se příliš pravděpodobné, že by všechny PAMP a DAMP s velmi rozdílnými strukturami mohly přímo interagovat s receptory NLR. Více pravděpodobná se jeví možnost, že všechny signály vedou k buněčnému stresu a následnému uvolnění vnitrobuněčných DAMP, které aktivují inflamazóm nepřímo, tedy bez interakce s NLR. Navrženy byly tři následující modely aktivace inflamazómu (Zambetti *et al.*, 2012).

První model je založen na uvolňování draselných iontů z buňky. Bylo ukázáno, že vazba extracelulárního adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na kanál P2X7, který se nachází na cytoplazmatické membráně a je selektivní pro kationty, vyvolává jeho otevření a rychlé uvolňování draselných iontů z buňky. Ztráta draselných iontů je nahrazována vtokem vápenatých iontů do buňky. Podobný účinek na hladinu draselných iontů v buňce mají i některé bakteriální toxiny. Ty fungují buď jako ionofory (např. nigericin), které usnadňují přenos iontů skrz membránu, nebo vytvářejí póry v cytoplazmatické membráně (např. toxiny maitotoxin, listeriolysin O, aerolysin), a způsobují tudíž uvolňování draselných iontů z buňky. Pokles koncentrace draselných iontů v buňce následně vede k sestavení inflamazómu a aktivaci kaspázy-1 (Freche *et al.*, 2007; Perregaux and Gabel, 1994;

Pétrilli *et al.*, 2007). Inhibice uvolňování draselných iontů z buňky vysokou koncentrací extracelulárních draselných iontů brání aktivaci inflamazómu. Stejně tak nedochází k aktivaci inflamazómu, pokud jsou blokovány signální dráhy spuštěné otevřením draselných kanálů či vznikem draselných pórů (Lamkanfi *et al.*, 2009; Pétrilli *et al.*, 2007).

Vazba ATP na protein P2X7 a některé bakteriální produkty (nigericin a maitotoxin) kromě uvolňování draselných iontů z buňky způsobují také aktivaci pannexinu-1. Pannexin-1 vytváří v buněčné membráně velký pór, kterým se mohou dostávat různé molekuly do buňky a naopak. Některé studie předpokládají, že pannexin-1 zprostředkovává průnik bakteriálních částí do buňky a následné sestavení inflamazómu, což je pro aktivaci kaspázy-1, maturaci pro-IL-1 $\beta$  a sekreci IL-1 $\beta$  nezbytné (Kanneganti *et al.*, 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006; Pelegrin and Surprenant, 2007). Uvedené mechanismy aktivace inflamazómu v závislosti na koncentraci draselných iontů v buňce jsou shrnuty na obr. 5.

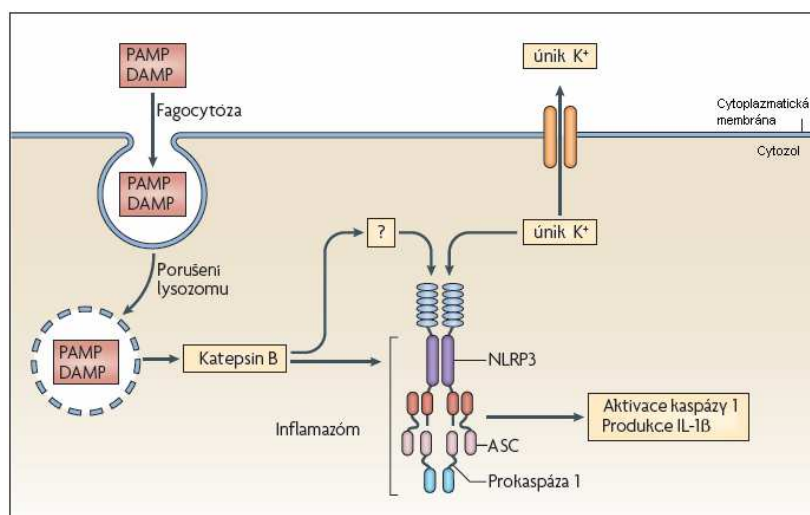
Přesný mechanismus, jímž nízká koncentrace draselných iontů v buňce umožňuje skládání inflamazómu, není znám. Je možné, že hlavní vliv na aktivaci inflamazómu mají obecně celkové změny v iontovém prostředí uvnitř buňky (Jin and Flavell, 2010).



**Obr. 5: Model aktivace inflamazómu NLRP3 založený na poklesu koncentrace draselných iontů v buňce.** Bakteriální toxiny vytvářejí v buněčné membráně pór, kterým z buňky unikají draselné ionty. Také vazba extracelulárního ATP na kanál P2X7 způsobuje jeho otevření a uvolňování draselných iontů z buňky. Pokles draselných iontů v buňce umožňuje aktivaci inflamazómu. Zároveň vazba ATP na P2X7 způsobuje formování pannexinu-1. Pannexin-1 tvoří pór, kterým do buňky vstupují molekuly obsahující DAMP a PAMP, což také podporuje aktivaci inflamazómu. Převzato a upraveno z Tschopp and Schroder, 2010.

Druhý model je založen na lysozomální nestabilitě. Pokud DC a makrofágy fagocytují částice, jako jsou krystaly soli kyseliny močové, azbestové a křemenné krystaly, či hliníkové soli, dochází k aktivaci inflamazómu. Tyto velké krystaly způsobují rozpad lysozomů. Z porušených lysozomů se následně uvolňuje proteáza katepsin B (obr. 6) a bylo ukázáno, že inhibice katepsinu B částečně snižuje aktivaci inflamazómu a uvolňování IL-1 $\beta$  z buněk. Také amyloid- $\beta$  (bílkovina, jež se nachází v neuronálních placích u Alzheimerovy choroby a pravděpodobně má roli v patogenezi této choroby) vyvolává lysozomální nestabilitu, aktivaci katepsinu B a inflamazómu NLRP3. Kromě krystalů a velkých částic způsobuje aktivaci katepsinu B, také nigericin (bakteriální ionofor). Mechanismus propojení katepsinu B a inflamazómu NLRP3 ale není znám. Dále bylo ukázáno, že porušení celistvosti lysozomů jiným mechanismem než krystaly a velkými částicemi také způsobuje aktivaci inflamazómu. Je tedy pravděpodobné, že aktivaci inflamazómu vyvolávají jednotlivé látky nepřímo tak, že způsobují porušení a vylití obsahu lysozomů (Halle *et al.*, 2008; Hentze *et al.*, 2003; Hornung *et al.*, 2008).

Na druhou stranu u myších makrofágů derivovaných z prekursorů z kostní dřeně (BMDM, z angl. bone marrow-derived macrophage) a BMDC postrádajících katepsin B byla aktivace kaspázy-1 a sekrece IL-1 $\beta$  po stimulaci krystaly kyseliny močové, solemi hliníku a hemazoinem (malarickým pigmentem) nezměněna. Je tedy možné, že použité inhibitory katepsinu B nejsou zcela selektivní a že klíčovou roli hraje jiná lysozomální proteáza než katepsin B (Dostert *et al.*, 2009).



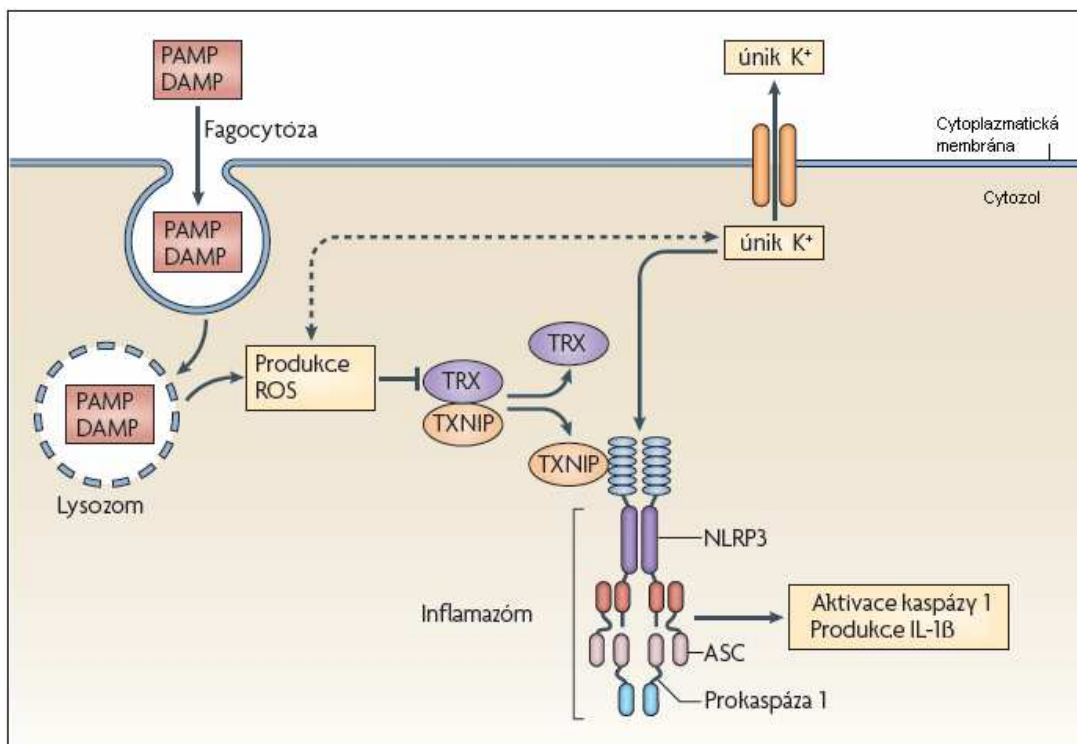
**Obr. 6: Model aktivace inflamazómu NLRP3 založený na lysozomální nestabilitě.** Fagocytóza krystalických a velkých částic způsobuje porušení lysozomální membrány a uvolnění katepsinu B. Katepsin B se přímo nebo zprostředkovaně podílí na aktivaci inflamazómu. Převzato a upraveno z Tschopp and Schroder, 2010.

Třetí model aktivace inflamazómu NLRP3 předpokládá roli ROS v tomto procesu. Bylo ukázáno, že ATP, nigericin i krystalické látky (azbestové a křemenné krystaly) v buňce vyvolávají produkci ROS. Pokud jsou ROS použitím specifických látek v buňce vychytány nebo je inhibitory blokována NADPH oxidáza (jeden z hlavních zdrojů ROS v makrofázích), nedochází k aktivaci inflamazómu. Tvorba ROS je často doprovázena uvolňováním draselných iontů z buňky, ale propojení těchto dvou dějů zatím není objasněno (Dostert *et al.*, 2008; Pétrilli *et al.*, 2007; Sorbara and Girardin, 2011).

Otázkou zůstává, co je zdrojem vyšší produkce ROS v buňce a jakým mechanismem zajišťují aktivaci inflamazómu. Navíc ne všechny látky, které vyvolávají tvorbu ROS v buňce, způsobují aktivaci inflamazómu (Tschopp and Schroder, 2010). Při stimulaci makrofágů krystaly kyseliny močové a azbestu, je za zdroj ROS považována NADPH oxidáza (Dostert *et al.*, 2008). Jiné studie předpokládají, že hlavním zdrojem jsou mitochondrie. To je podpořeno možným vysvětlením aktivace inflamazómu účinkem ROS, jež zahrnuje interakci proteinu TXNIP (z angl. thioredoxin-interacting protein) s proteinem NLRP3. V klidových buňkách je TXNIP vázán na TRX (thioredoxin). Po stimulaci buněk např. krystaly kyseliny močové dochází k zvýšení hladiny ROS v buňce, což ústí v uvolnění TXNIP od TRX a vazbě TXNIP na NLRP3. Chybí-li TXNIP, je aktivita kaspázy-1 sice snížena, ale nikoli úplně. V aktivaci inflamazómu ROS tak budou mít uplatnění i jiné dráhy (Zhou *et al.*, 2010). Popsané mechanismy aktivace inflamazómu v důsledku vyšší produkce ROS v buňce jsou znázorněny na obr. 7.

Další studie naopak ukazuje zcela jiný způsob, jak ROS ovlivňují produkci IL-1 $\beta$ . Inhibice tvorby ROS v buňce snižuje expresi pro-IL-1 $\beta$ , což vede k předpokladu, že ROS kromě aktivity kaspázy-1 ovlivňují také první signál způsobující expresi prekurzoru IL-1 $\beta$  (Asehnoune *et al.*, 2004).

Je zapotřebí dalších výzkumů, aby se zjistilo, zda některý z uvedených modelů může představovat hlavní mechanismus aktivace inflamazómu. Roli v tom, který model se v daném případě uplatní, zcela jistě hraje typ buněk, typ stimulu, délka a jiné podmínky stimulace. Zdá se, že samotné snížení koncentrace draselných iontů v buňce není pro aktivaci inflamazómu dostatečné, navíc i ostatní dva modely mají nedostatky. Je tudíž možné, že jednotlivé dráhy se vzájemně ovlivňují a že buňky reagují na nějaký společný rys všech těchto modelů, který je spojen s nepříznivou situací, v níž se buňka nachází.



**Obr. 7: Model aktivace inflamazómu NLRP3 založený na zvýšené produkci reaktivních kyslíkatých intermediátů v buňce.** Fagocytóza krystalických a velkých látek, stejně jako molekuly DAMP (např. ATP), vyvolávají v buňce zvýšenou produkci ROS. Vyšší hladina ROS umožňuje aktivaci inflamazómu. Jeden z možných mechanismů je, že ROS vyvolávají uvolnění proteinu TRX od proteinu TXNIP, ten se následně přímo váže na NLRP3 a aktivuje inflamazóm. Převzato a upraveno z Tschopp and Schroder, 2010.

Na rozdíl od dendritických buněk a makrofágů stačí u monocytů pro sekreci IL-1 $\beta$  pouze první signál, tedy ten, který vede k expresi pro-IL-1 $\beta$ . Druhý signál způsobující skládání inflamazómu a aktivaci kaspázy-1 již u lidských krevních monocytů není nutný, neboť tyto buňky již mají kaspázu-1 aktivní. Nicméně i v tomto případě je aktivita kaspázy-1 závislá na seskupení inflamazomových proteinů a jejich zablokování inhibuje aktivitu kaspázy-1 a maturaci IL-1 $\beta$ . Také u monocytů se pro úspěšnou sekreci IL-1 $\beta$  zdá být nutná zvýšená hladina ROS a/nebo snížená hladina draselných iontů v buňce (Hewinson *et al.*, 2008; Netea *et al.*, 2009; Netea *et al.*, 2010; Tassi *et al.*, 2009).

Kromě konstitutivní aktivace kaspázy-1 je další možnou příčinou toho, že monocyty nevyžadují 2. signál, pozorování, že stimulace monocytů bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) (na rozdíl od stimulace makrofágů) vede k uvolňování endogenního ATP. ATP se následně váže na kanál P2X7, což je nezbytné pro následnou maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  (Netea *et al.*, 2009; Piccini *et al.*, 2008). Podle jiné studie jsou maturace a uvolňování IL-1 $\beta$  z monocytů závislé na uvolňování endogenního ATP a jeho vazbě na protein P2X7 pouze při krátkodobé (3 hod) stimulaci. Naopak při dlouhodobé

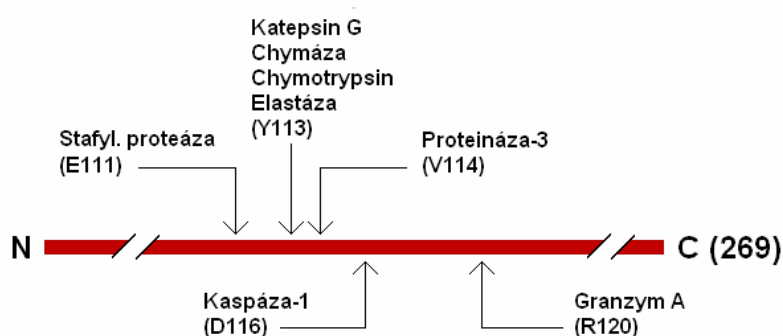


(24 hod) stimulaci je maturace a uvolňování IL-1 $\beta$  podle autorů studie nezávislé jak na ATP, tak na kanálu P2X7 (Ward *et al.*, 2010).

Možné vysvětlení, proč se monocyty a makrofágy liší v aktivitě inflamazómu a kaspázy-1, nabízí jejich úloha v imunitním systému a jejich výskyt v organismu. Monocyty cirkulující krví se běžně s patogeny nesetkávají. Aktivní kaspáza-1 jim umožňuje rychle reagovat na nebezpečné podněty, pokud by se v organismu vyskytly. Naopak u makrofágů, které se nacházejí v místech exponovaných různým vnějším podnětům a mikrobům (plíce, střeva), není žádoucí, aby na každý takovýto podnět reagovaly produkcí prozánětlivých cytokinů. Makrofágy obdrží druhý signál, který umožní maturaci a sekreci IL-1 $\beta$ , pouze pokud dojde k lokální infekci či poškození buněk (Netea *et al.*, 2009).

### 3.4.2.2 Dráha nezávislá na kaspáze-1

Kromě kaspázy-1 může být pro-IL-1 $\beta$  štěpen do své aktivní formy řadou dalších proteáz. Z rodiny kaspáz by v maturaci pro-IL-1 $\beta$  mohla být zapojena také kaspáza-5 a kaspáza-8 (Burns *et al.*, 2003; Maelfait *et al.*, 2008). Jinak se jedná především o proteázy neutrofilů, jako je elastáza a katepsin G, proteináza 3 či proteázy mastocytů: chymáza a granzym A. Ty štěpí pro-IL-1 $\beta$  sice extracelulárně (prekurzory mohou být uvolněny např. z monocytů a makrofágů v místě zánětu) a na jiné pozici než kaspáza-1, přesto jsou tyto formy IL-1 $\beta$  biologicky aktivní (Coeshott *et al.*, 1999; Guma *et al.*, 2009; Hazuda *et al.* 1990; Irmiler *et al.*, 1995; Mizutani *et al.*, 1991). Dále bylo ukázáno, že pro-IL-1 $\beta$  je štěpen také trypsinem, chymotrypsinem, kolagenázami, metaloproteinázami a také bakteriálními enzymy (Black *et al.*, 1988; Hazuda *et al.*, 1990; Kapur *et al.*, 1993; Schönbeck *et al.*, 1998). Místa štěpení pro-IL-1 $\beta$  jsou znázorněna na obr. 8.



**Obr. 8: Maturace pro-interleukinu-IL-1 $\beta$  nezávislá na kaspáze-1.** Na 269 AK dlouhém prekurzoru IL-1 $\beta$  jsou znázorněny aminokyseliny a jejich pozice rozeznávané proteázami, jež jsou schopné pro-IL-1 $\beta$  maturovat. Převzato a upraveno podle Dinarello *et al.*, 2011.

### 3.4.3 Uvolňování interleukinu-1 $\beta$ z buňky

Pro-IL-1 $\beta$  je syntetizován v buněčném cytozolu bez sekreční signální sekvence, což znemožňuje jeho sekreci dráhou zahrnující endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát (Rubartelli *et al.*, 1990). Dnes je známo několik možností, jak je IL-1 $\beta$  uvolňován z buněk (obr. 9), která z nich je hlavní, je ale stále předmětem bádání.

První návrhy byly založeny na představě uvolňování IL-1 $\beta$  ve chvíli, kdy je poškozena buněčná membrána, bez účasti specifické sekreční dráhy (Hogquist *et al.*, 1991).

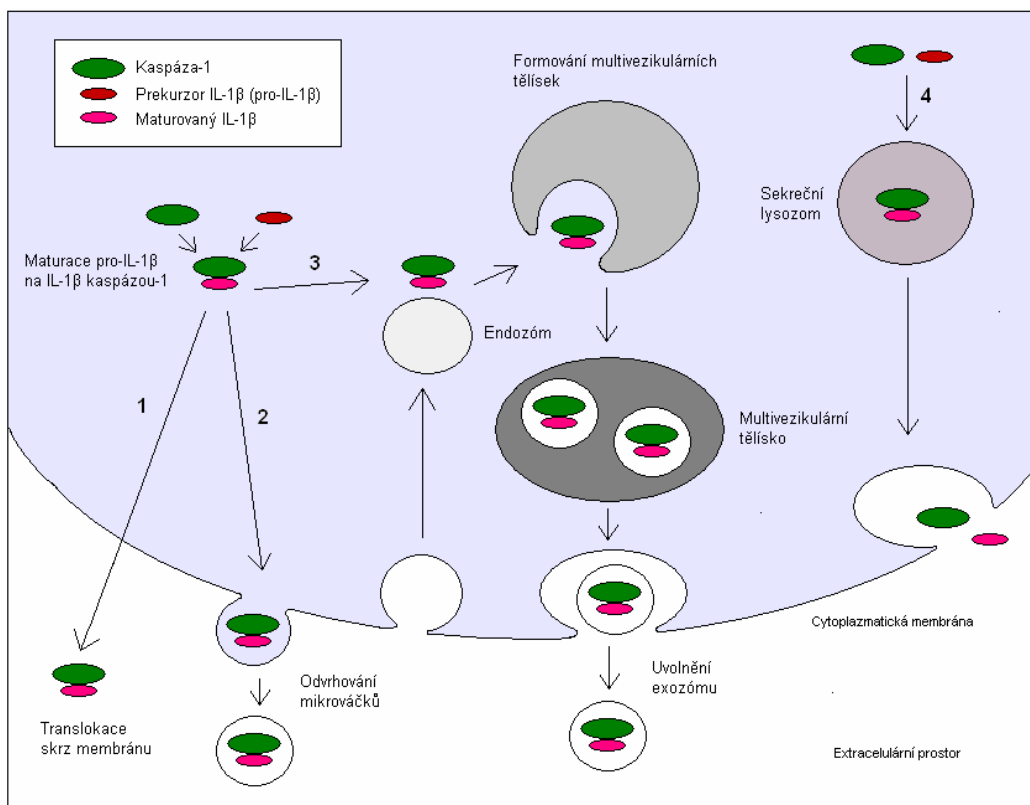
Jiný mechanismus vychází z poznatku, že kromě cytozolu může být pro-IL-1 $\beta$  kaspázou-1 maturován také v sekrečních lysozomech. Následná exocytóza sekrečních lysozomů uvolňuje IL-1 $\beta$  z buňky. Proces exocytózy sekrečních lysozomů je u monocytů spuštěn stimulací buněk ATP a vyžaduje pokles koncentrace draselných a nárůst koncentrace vápenatých iontů v buňce a aktivaci fosfolipázy C a A2 (Andrei *et al.*, 2004).

Jinou možností je odvrhování mikrováček z cytoplazmatické membrány. V prvotních studiích se předpokládalo, že mechanismus tohoto děje je u monocytů a DC závislý na receptoru TLR, proteinu P2X7 a jeho interakci s ATP. Pozdější práce ale ukazují, že pro odvrhování váček s IL-1 $\beta$  je u monocytů dostačující pouze signál přes receptor TLR, přičemž ATP sekreci následně pouze zvyšuje. Vazba ATP na P2X7 bez stimulace receptoru TLR u monocytů vede k nespecifickému odvrhování váček z membrány, kdy tyto váčky neobsahují IL-1 $\beta$  (MacKenzie *et al.*, 2001; Pizzirani *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2010).

Další variantu představuje uvolňování IL-1 $\beta$  z makrofágů přímo skrz cytoplazmatickou membránu (Brough and Rothwell, 2007).

Představa uvolňování IL-1 $\beta$  popsaná u BMDM je založena na maturaci pro-IL-1 $\beta$  kaspázou-1 v cytozolu v blízkosti endozomů. Po naplnění endozomů IL-1 $\beta$  se formují multivezikulární tělíska, která následně fúzí s cytoplazmatickou membránou a uvolňují IL-1 $\beta$  ven ve váčkách, označovaných jako exozomy (Qu *et al.*, 2007).

V poslední době se také objevují výzkumy, které ukazují přímou roli kaspázy-1 v sekreci bílkovin postrádajících signální sekvenci, zatím však nebyly zaměřeny na IL-1 $\beta$  (Keller *et al.*, 2008; Nickel a Rabouille, 2009).



**Obr. 9: Mechanismy uvolňování IL-1 $\beta$  z buňky.** (1) Uvolňování IL-1 $\beta$  skrz cytoplazmatickou membránu. (2) Uvolňování IL-1 $\beta$  v mikrováčkách odvrhovaných z cytoplazmatické membrány. (3) Formování multivezikulárních tělísek s IL-1 $\beta$  a sekrece exozómů, jež uvolňují IL-1 $\beta$  z buňky. (4) Maturace a sekrece IL-1 $\beta$  v sekrečních lysozomech. Podle Nickel a Rabouille, 2009.

### 3.4.4 Význam interleukinu-1 $\beta$ u autoimunitních onemocnění

IL-1 $\beta$  je důležitým regulátorem imunitních reakcí, které organismus chrání při infekci patogenů, na druhou stranu je však známé i jeho negativní působení u autoimunitních onemocnění. Nejvýznamnější roli má IL-1 $\beta$  u akutně či chronicky zánětlivých autoimunitních chorob (tzv. autoinflamatorní choroby), jako je familiární středomořská horečka, Muckle-Wells syndrom (MWS), novorozenecký multisystémový zánětlivý syndrom (NOMID), hyperIgD syndrom, ale také nespecifické střevní záněty a jiné. Předpokládá se, že u těchto onemocnění nejsou přítomné autoreaktivní T buňky, nedochází k produkci autoprotilátů a že za patogenezi nemoci jsou naopak odpovědné špatně fungující buňky přirozené imunity přímo řídící zánětlivou odpověď (monocyty, makrofágy). Mezi mutované geny objevené u autoinflamatorních chorob patří mimo jiné i geny přímo nebo nepřímo regulující IL-1 $\beta$  (Dinarello, 2011). U některých z těchto onemocnění (konkrétně juvenilní idiopatická artritida, MWS a NOMID) bylo ukázáno, že

monocyty získané z krve pacientů po aktivaci sekretují větší množství IL-1 $\beta$  než monocyty zdravých dárců (Gattorno *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2005). Také u mononukleárních buněk vyizolovaných ze střevní tkáně pacientů s nespecifickými střevními záněty (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida) byla pozorována zvýšená spontánní i stimulací vyvolaná sekrece IL-1 $\beta$  (Mahida *et al.*, 1989; Reinecker *et al.*, 1993). Podle genetických studií se navíc patogeneze Crohnovy choroby zdá být spojená receptory NOD a NLR (Cummings *et al.*, 2010; Hugot *et al.*, 2001).

Účinky působení IL-1 $\beta$ , popsané výše, způsobují při nekontrolované dlouhodobé sekreci IL-1 $\beta$  patologickou imunitní reakci. Při podání látek, které blokují signalizaci IL-1 $\beta$ , dochází u pacientů s autoinflamatorním onemocněním k útlumu projevů hyperaktivované imunitní reakce a remisi onemocnění. To dokládá, že IL-1 $\beta$  má zásadní roli v celém procesu (Furst, 2004; Pascual *et al.*, 2005).

Protože se ale nově ukazuje, že u některých z autoinflamatorních nemocí jsou přítomné autoprotilátky a v patogenezi jsou zapojeny buňky adaptivní imunity, jednoznačnou hranici mezi autoinflamatorními a autoimunitními chorobami nelze určit. Navíc každé autoimunitní onemocnění do jisté míry doprovází patologický zánět, dá se proto rovněž předpokládat, že IL-1 $\beta$  bude hrát důležitou úlohu v řadě autoimunitních onemocnění, tedy včetně celiakie (Kastner *et al.*, 2010).

V případech IL-1 $\beta$  v souvislosti s celiakií byly publikovány následující výsledky studií. Séra odebraná pacientům s neléčenou celiakií obsahují zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů včetně IL-1 $\beta$  (Fornari *et al.*, 1998; Manavalan *et al.*, 2010). U PBMC a monocytů izolovaných z krve pacientů s neléčnou celiakií byla po stimulaci gliadinem pozorována vyšší sekrece IL-1 $\beta$  než u buněk izolovaných z krve zdravých dárců (Harris *et al.*, 2008). Korelace jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) v genu kódujícím IL-1 $\beta$  (ani IL-1 $\alpha$  a IL-18) nebyla s výskytem celiakie u jejich nositelů potvrzena. Avšak současný výskyt SNP na dvou různých pozicích v genu pro IL-1 $\beta$  nebo současný výskyt SNP v genu pro IL-1 $\beta$  společně s SNP v genu pro TNF- $\alpha$  korelaci s celiakií již vykazovaly (Cherňavsky *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2005). Byl nalezen také SNP v genu pro NLRP3, který se zdá být predispoziční pro celiakii (Pontillo *et al.*, 2010; Pontillo *et al.*, 2011).

Tyto studie ukazují, že IL-1 $\beta$  by mohl být v patogenezi celiakie zapojen. Dosavadní poznatky jsou ale omezené pouze na výše uvedená data. Jak klíčovou roli hraje a jaké přesné mechanismy a signální dráhy se uplatňují v regulaci jeho exprese a maturace známo není.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Přístroje

Bürkerova komůrka, Meopta, ČR

Centrifuga BR 4i, Jouan, Francie

Centrifuga EBA12, Hettich Zentrifugen, SRN

Centrifuga Multispeed IEC CL31R, Thermo ELECTRON CORPORATION, USA

CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-15AC, SANYO, Japonsko

Digitální váhy HM120, A&D Instruments, USA

Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko

Magnetická míchačka MICRO STIRRER, VELP® SCIENTIFICA, Itálie

Magnetická míchačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Microplate Reader ELx800™, BioTek, USA

Mrazicí box (-80 °C), SANYO, Japonsko

Laminární box ANTARES 72, STERIL-ANTERES, Itálie

Laminární box BIOCYT 150, Esi Flufrance, Francie

Lednice a mrazák BKF 403, Vestfrost, Dánsko

Lednice a mrazák, Amica, Polsko

pH metr 3510, Jenway, Velká Británie

Průtokový cytometr LSR II, BD Biosciences, USA

Přístroj pro detekci luminiscence LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System),  
Fuji, Japonsko

Pumpa na míchání gradientu Peristaltic Pump P-1, GE Healthcare, Velká Británie

Termostat Tempette Heating system TE-8D, Techne, Velká Británie

Třepačka Duomax 1030, Heidolph, SRN

Třepačka OS-10 Orbital Shaker, Biosan, USA

Třepačka Vibramax 110, Heidolph, SRN

Ultrasonikátor Soniprep 150, MSE, Velká Británie

Vodní lázeň Techne Shaking Bath SB-16, Techne, Velká Británie

Vortex CVLab, GILSON, USA

Zařízení pro elektroforézu Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad, USA

Zařízení pro Western blot Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad, USA

Zdroj napětí EC6000-90, E-C Apparatus Corporation, USA

Zdroj napětí PowerPac™ Universal, Bio-Rad, USA

#### 4.1.2 Seznam použitých chemikálií

30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu (poměr akrylamid/bisakrylamid 29 : 1),

Bio-Rad, USA

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), Sigma-Aldrich, USA

Adenosin-5'-trifosfát (ATP), Sigma-Aldrich, USA

Antibiotika (roztok 100x koncentrovaný, 10 000 U/ml penicilin, 10 mg/ml

streptomycin), Sigma-Aldrich, USA

Bovinní sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich, USA

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA

Citronan sodný dihydrát, Lachema, ČR

Coomassie Brilliant Blue G250, Serva, SRN

Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, Lachema, ČR

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN

Ethanol absolutní, Merk, SRN

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), Sigma-Aldrich, USA

Fetální bovinní sérum (FBS), Lonza, Švýcarsko

Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare, Velká Británie

Fyziologický roztok v injekční vodě (0,9% NaCl), Ardeapharma, ČR

Gliadin (z pšeničného glutenu), Sigma-Aldrich, USA

Glycerol, Lachema, ČR

Glycin, Lach-Ner, ČR

Granulocytární, monocytární růstový faktor (GM-CSF), dar Laboratoře

molekulární biologie bakteriálních patogenů Doc. Petra Šeba, MBU

AVČR

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lachema, ČR

Hydrogenuhlíčan sodný, Lachema, ČR

Hydroxid sodný, Lach-Ner, ČR

Chlorid draselný, Lachema, ČR

Chlorid sodný, Lach-Ner, ČR

Izopropanol, Lachema, ČR

Kit na detekci aktivní kaspázy-1 – Green FLICA™ Caspase 1 Assay Kit,  
ImmunoChemistry Technologies, USA

Kit na detekci chemiluminiscence - Super signal west femto max. sensitivity  
substrate, Thermo Scientific, USA

Kit na detekci IL-1 $\alpha$  – Human IL-1 $\alpha$  ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, USA

Kit na detekci IL-1 $\beta$  – Human IL-1 $\beta$  ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, USA

Kit na detekci IL-1 $\beta$  – Mouse IL-1 $\beta$  ELISA MAX™ Standard, BioLegend, USA

Kit na detekci TNF- $\alpha$  – DuoSet Human TNF- $\alpha$ , R&D Systems, USA

Kit na přípravu celobuněčných lyzátů – Nuclear Extract Kit, Aktive Motif, Belgie

Kit na stanovení koncentrace bílkovin – BCA™ Protein Assay Kit, Thermo  
Scientific, USA

Kyselina citronová monohydrát, Lachema, ČR

Kyselina chlorovodíková, Lachema, ČR

Kyselina octová, Lach-Ner, ČR

Kyselina sírová, Lachema, ČR

L-glutamin, Sigma-Aldrich, USA

Lipopolysacharid (LPS) z *Escherichia coli* 0111:B4, Ultra Pure, InvivoGen, USA

Lipopolysacharid (LPS) z *Shigella flexneri*, Sigma-Aldrich, USA

Lyzační pufr – Cell Lysis Buffer (10X), Cell Signaling Technology, USA

Methanol, Lach-Ner, ČR

Neesenciální aminokyseliny (100x koncentrované), Biochrom, SRN

N,N-dimethylformamid (DMFA), Penta, ČR

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, SRN

Pepsin-agaróza, MP Biomedicals, Francie

Peroxid vodíku 30%, Lachema, ČR

Persíran amonný (APS), Lachema, ČR

Poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (polyHEMA), Sigma-Aldrich, USA

Ponceau S, Serva, SRN

Proteinový SDS-PAGE standard (barevný, s širokým rozsahem), Bio-Rad, USA

Pyruvát sodný (100 mM roztok), Sigma-Aldrich, USA

Regenerační pufr na membrány – Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer,  
Thermo Scientific, USA

RPMI-1640 médium, Lonza, Švýcarsko

Tris, Serva, SRN

Tris-Pufr (1 M roztok, pH 6,8), AppliChem, SRN

Tris-HCl (1,5 M roztok, pH 8,8), Bio-Rad, USA

Trypanová modř, Sigma-Aldrich, USA

Tween 20, Duchefa, Nizozemsko

Uhličitan sodný, Lachema, ČR

Voda pro injekce, Fresenius Kabi, SRN

$\beta$ -merkaptoethanol, Sigma-Aldrich, USA

### **4.1.3 Použité buňky**

#### **4.1.3.1 Lidské PBMC a monocyty**

Lidské PBMC a monocyty byly izolovány z krve 35 pacientů s neléčenou celiakií a 10 zdravých dárců. Odběr krve byl proveden do zkumavek s citrátem sodným, jež brání srážení krve. Krevní vzorky pacientů s celiakií poskytla následující pracoviště:

Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Gastroenterologická ambulance 4. interní kliniky, Doc. MUDr. Miloš Dvořák

Poliklinika Zelený Pruh, Praha 4 - Braník, Gastroenterologická ambulance, MUDr. Daniela Tůmová

Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Gastroenterologická ambulance, as. MUDr. Iva Hoffmanová

#### **4.1.3.2 Myší BMDC**

Myší BMDC byly připraveny z prekursorů získaných výplachem kostní dřeně stehenní a holenní kosti myši. Myši poskytl Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics. Jednalo se o myši kmene C57BL/6 a C57BL/10 (sloužící jako kontroly) postrádající funkční proteiny MyD88, TRIF, NLRP3, ASC, IL-1R (na pozadí C57BL/6), TLR2, TLR4 a TLR2/4 (na pozadí C57BL/10).

### **4.1.4 Seznam použitých inhibitorů**

Inhibitor kaspázy-1, Z-YVAD-fmk, Santa Cruz Biotechnology, USA

Inhibitor draselných kanálů, quinidine, Sigma-Aldrich, USA

Inhibitor draselných kanálů řízených vazbou ATP a aktivace inflamazómu

NLRP3, glybenclamide, Sigma-Aldrich, USA

Inhibitor kanálu P2X7, KN-62, Sigma-Aldrich, USA

Inhibitor ROS, N-Acetyl-L-cystein, Sigma-Aldrich, USA



Inhibitor aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, TPCK, Sigma-Aldrich, USA

Inhibitor kinázy ERK, UO126, Cell Signaling Technology, USA

Inhibitor kinázy JNK, SP600125, Sigma-Aldrich, USA

Inhibitor kinázy p38, SB203580, Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.5 Seznam použitých protilátek

Neutralizační myší monoklonální protilátka IgA proti lidskému TLR2,

InvivoGen, USA

Neutralizační myší monoklonální protilátka IgG1 proti lidskému TLR4,

InvivoGen, USA

Myší monoklonální protilátka proti lidskému IL-1 $\beta$ /IL-1F2, R&D Systems, USA

Králičí polyklonální protilátka proti lidskému štěpenému IL-1 $\beta$  (D116),

Cell Signaling Technology, USA

Králičí polyklonální protilátka proti lidské kaspáze-1 (A-19),

Santa Cruz Biotechnology, USA

Králičí polyklonální protilátka proti podjednotce p10 lidské kaspázy-1 (C-20),

Santa Cruz Biotechnology, USA

Krysí monoklonální protilátka proti myším IL-1 $\beta$ /IL-1F2, R&D Systems, USA

Králičí polyklonální protilátka proti beta-aktinu, Abcam, USA

Oslí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti myším IgG (H+L),

Jackson ImmunoResearch, USA

Kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti králičímu IgG (H+L),

Cell Signaling Technology, USA

Kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti krysímu IgG (H+L),

Cell Signaling Technology, USA

#### 4.1.6 Připravovaná kultivačních média

Kompletní RPMI-1640 médium na kultivaci lidských PBMC a monocytů:

RPMI-1640 médium

FBS (inaktivované 30 min, 56 °C)      10 % (v/v)

L-glutamin      2 mM

Streptomycin      100  $\mu$ g/ml

Penicilin      100 U/ml

### Kompletní RPMI-1640 médium na kultivaci myších BMDC:

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| RPMI-1640 médium                  |            |
| FBS (inaktivované 30 min, 56 °C)  | 10 % (v/v) |
| L-glutamin                        | 2 mM       |
| Neesenciální aminokyseliny (100x) | 1 % (v/v)  |
| Pyruvát sodný                     | 1 mM       |
| β-merkптоethanol                  | 50 μM      |
| GM-CSF                            | 20 ng/ml   |
| Streptomycin                      | 100 μg/ml  |
| Penicilin                         | 100 U/ml   |

### **4.1.7 Připravované roztoky a pufry**

#### Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue G250 | 1,25 g |
| Kyselina octová               | 50 ml  |
| Methanol                      | 225 ml |
| dH <sub>2</sub> O             | 225 ml |

#### Blotovací pufr:

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| Glycin            | 11,52 g                            |
| Tris              | 2,4 g                              |
| Methanol          | 160 ml                             |
| dH <sub>2</sub> O | doplnit do celkového objemu 800 ml |

#### Citrátový pufr (pH 4,2):

|  |                   |
|--|-------------------|
| Citronan sodný dihydrát                              | 2,94 g            |
| dH <sub>2</sub> O                                    | doplnit do 100 ml |
| Přídavkem 1M kyseliny citronové se upraví pH na 4,2. |                   |

#### Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Methanol          | 400 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 500 ml |
| Kyselina octová   | 100 ml |

PBS (10x koncentrovaný) (pH 7,2–7,4):

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| NaCl   | 90 g                                |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O   | 2g                                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 12 g                                |
| dH <sub>2</sub> O                                    | doplnit do celkového objemu 1000 ml |

Přídavkem 1 M NaOH se upraví pH na 7,2 až 7,4.

Před použitím se ředí na 1x koncentrovaný.

Promývací pufr na metodu ELISA (pH 7,2–7,4):

|                  |              |
|------------------|--------------|
| PBS (pH 7,2–7,4) |              |
| Tween 20         | 0,05 % (v/v) |

Roztok Ponceau S:

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| 5% kyselina octová |             |
| Ponceau S          | 0,1 % (w/v) |

Ředící roztok na metodu ELISA (pH 7,2–7,4):

|                  |           |
|------------------|-----------|
| PBS (pH 7,2–7,4) |           |
| BSA              | 1 % (w/v) |

SeparáčnÍ gel na SDS-PAGE elektroforézu:

5% gel:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O                   | 5,7 ml  |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8              | 2,5 ml  |
| 30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu | 1,65 ml |
| 10% (w/v) SDS                       | 100 µl  |
| 10% (w/v) APS                       | 50 µl   |
| TEMED                               | 5 µl    |

20% gel:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O                   | 0,75 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8               | 2,5 ml  |
| 30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu | 6,6 ml  |
| 10% (w/v) SDS                       | 100 µl  |

|               |            |
|---------------|------------|
| 10% (w/v) APS | 50 $\mu$ l |
| TEMED         | 5 $\mu$ l  |

Na pumpě pro míchání gradientových gelů se smícháním 2,3 ml roztoku pro 5% gel a 1,8 ml roztoku pro 20% gel připraví 5-20% gradientový polyakrylamidový gel.

Skladovací pufr na pepsin-agarózový gel (pH 4,5):

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| dH <sub>2</sub> O                     | 50 ml        |
| NaCl                                  | 430 mg       |
| 99% CH <sub>3</sub> COOH ředěná 1/100 | 29,5 $\mu$ l |

Přídavkem koncentrované CH<sub>3</sub>COOH se upraví pH na 4,5.

Substrátový roztok na metodu ELISA:

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Citrátový pufr     | 100 ml     |
| TMB roztok         | 100 ml     |
| Peroxid vodíku 30% | 40 $\mu$ l |

TBS (10x koncentrovaný) (pH 7,6):

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| NaCl              | 80 g                                |
| Tris              | 24,2 g                              |
| dH <sub>2</sub> O | doplnit do celkového objemu 1000 ml |

Přídavkem HCl se upraví pH na 7,6.

Před použitím se ředí na 1x koncentrovaný.

TBST (pH 7,6):

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 1x konc. TBS (pH 7,6) |             |
| Tween 20              | 0,2 % (v/v) |

TMB roztok:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| TMB               | 40 mg |
| DMFA              | 27 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 73 ml |

TMB se rozpustí v DMFA a skleněnou pipetou vnese do destilované vody.

Tris-glycinový pufr (5x koncentrovaný) (pH 8,3):

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| Tris              | 15 g                                |
| Glycin            | 72 g                                |
| SDS               | 5 g                                 |
| dH <sub>2</sub> O | doplnit do celkového objemu 1000 ml |

Před použitím se ředí na 1x koncentrovaný.

Uhličitanový pufr na metodu ELISA (pH 9,5):

|                                 |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub>              | 8,4 g                               |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 3,6 g                               |
| Destilovaná voda                | doplnit do celkového objemu 1000 ml |

Vzorkový pufr na SDS-PAGE elektroforézu (5x koncentrovaný):

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 1 M Tris-Pufr, pH 6,8 | 3 ml  |
| SDS                   | 1 g   |
| Glycerol              | 5 ml  |
| β-merkaptoethanol     | 2 ml  |
| Bromfenolová modř     | 25 mg |

Zaostřovací gel na SDS-PAGE elektroforézu (5%)

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| dH <sub>2</sub> O                   | 6,1 ml |
| 1 M Tris-Pufr, pH 6,8               | 2,5 ml |
| 30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu | 1,3 ml |
| 10% (w/v) SDS                       | 100 μl |
| 10% (w/v) APS                       | 50 μl  |
| TEMED                               | 10 μl  |

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Příprava gliadinových fragmentů enzymatickým štěpením**

Gliadin byl intenzivním třepáním (pokojová teplota, 1-2 hodiny) rozpuštěn v 0,1M HCl (pH 1,8) tak, aby konečná koncentrace gliadinu byla 10 mg/ml. Ke štěpení gliadinu na gliadinové fragmenty byl použit pepsin-agarózový gel, který byl uchováván ve

skladovacím pufru při 4 °C. Po centrifugaci pepsin-agarózového gelu ve skladovacím pufru (4000 rpm, 5 min, 20 °C) byl skladovací pufr odstraněn, gel byl promyt 10 ml destilované vody a centrifugován (4000 rpm, 5 min, 20 °C). Promytí destilovanou vodou bylo opakováno celkem třikrát. Poté byl gel promyt 10 ml roztoku 0,1M HCl. Promytí HCl bylo opakováno opět celkem třikrát. Následně bylo k 5 ml promyтого pepsin-agarózového gelu přidáno 7 ml roztoku gliadinu o koncentraci 10 mg/ml a společně inkubováno za intenzivního třepání při 37 °C po 45 min. Štěpení bylo zastaveno centrifugací (4000 rpm, 5 min, 4 °C) a odebráním roztoku štěpeného gliadinu od pepsin-agarózového gelu. Roztok štěpeného gliadinu byl opět centrifugován (4000 rpm, 5 min 4 °C), aby se odstranil zbylý gel. Následně byl roztok štěpeného gliadinu rozdělen do alikvót a uchováván při -20 °C. Pro všechny stimulační pokusy byl použit pouze štěpený gliadin. Pro vyloučení kontaminace LPS byly vzorky štěpeného gliadinu testovány E-toxate testem, který provedl RNDr. Zdeněk Zídek, DrSc. z ÚEM AVČR. Pro pokusy byly použity pouze ty, které měly obsah LPS nižší než je detekční limit (2 pg/ml).

## **4.2.2 Příprava buněk**

### **4.2.2.1 Izolace lidských PBMC**

Lidské PBMC byly získány gradientovou centrifugací krve, odebrané pacientům s neléčenou celiakií a zdravým dárčům do zkumavek obsahujících citrát sodný, jež brání srážení krve. Přibližně 20 ml krve bylo naředěno 10 ml PBS, navrstveno na 15 ml roztoku Ficoll-Paque™ Plus a centrifugováno (1800 rpm, 30 min, 4 °C). Centrifugací na ficollovém gradientu došlo k rozdělení jednotlivých krevních složek. Odebrán byl hustý bílý prstenec nad roztokem Ficoll-Paque™ Plus obsahující periferní mononukleární buňky (zejména monocyty a lymfocyty). PBMC byly následně třikrát promyty 20 ml PBS, při centrifugaci (10 min, 4 °C) byly rpm postupně snižovány na následující hodnoty: po prvním promytí 1200 rpm, po druhém promytí 1000 rpm a po třetím promytí 800 rpm. Po posledním promytí byl odstraněn PBS, PBMC byly resuspendovány v 10 ml kompletního RPMI média a spočítány v Bürkerově komůrce. PBMC v požadované koncentraci byly nasazeny do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) a stimulovány.

### **4.2.2.2 Izolace lidských monocytů z PBMC**

Oddělení lidských monocytů od zbylých PBMC bylo provedeno pomocí jejich adherence na plastový povrch. Lidské PBMC, v kompletním RPMI médiu nasazené do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk na jamku, byly

necháány při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> po 2 hodiny adherovat k plastiku. Neadherentní buňky byly odstraněny odsátím média a promytím jamek 0,5 ml PBS. K adherentním monocytům bylo do každé jamky přidáno 100 µl nového kompletního RPMI média. Následně byly buňky stimulovány.

#### **4.2.2.3 Izolace a diferenciacie myších BMDC**

Myší BMDC byly připraveny diferenciací buněčných prekurzorů z kostní dřene. Z usmrcené myši byly vypreparovány stehenní a holenní kosti. Kosti byly omyty PBS a papírovým ubrouskem navlhčeným v ethanolu byly odstraněny zbytky svaloviny. Následně byly odstřiženy kloubní hlavice a kosti byly vypláchnuty vždy 10 ml PBS. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes filtr s póry o rozměru 70 µm (BD Bioscience, USA) a centrifugována (1200 rpm, 30 min, 4 °C). Po odstranění PBS byly buňky resuspendovány v 30 ml kompletního RPMI pro myší BMDC a spočítány v Bürkerově komůrce.

Buňky byly nasazeny na 90mm Petriho misky (GAMA, ČR) v koncentraci 4 x 10<sup>6</sup> buněk/10 ml kompletního RPMI pro myší BMDC. Buňky byly inkubovány 7 dní při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Třetí den inkubace bylo k buňkám do každé Petriho misky přidáno 10 ml kompletního RPMI pro myší BMDC. Šestý den inkubace bylo z každé misky odebráno 10 ml média s buňkami a centrifugováno (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Peleta buněk byla resuspendována v 10 ml kompletního RPMI pro myší BMDC a vrácena k zbylým buňkám na Petriho misky. Sedmý den byly diferencované BMDC uvolněné v médiu sebrány. Misky byly opláchnuty proudem RPMI média, aby se uvolnily přichycené buňky. Buněčná suspenze byla centrifugována (1200 rpm, 10 min, 4 °C), po odstranění média byly BMDC převedeny do 30 ml kompletního RPMI média pro myší BMDC a spočítány v Bürkerově komůrce. BMDC v požadované koncentraci byly nasazeny do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) a stimulovány.

#### **4.2.2.4 Stanovení koncentrace buněk v Bürkerově komůrce**

Buněčná suspenze byla smíchána v objemovém poměru 1 : 1 s Trypanovou modří a nanesena na Bürkerovu komůrku. Bylo spočítáno množství buněk ve 12 polích a stanoven průměrný počet buněk na jedno pole.

Celkový počet buněk v 1 ml (*n*) byl určen podle vzorce:

$$n = 50 \times 10^5 \times \text{průměrný počet buněk na jedno pole.}$$

### 4.2.3 Stanovení cytokinové sekrece ELISA testem

#### 4.2.3.1 Stimulace buněk

PBMC byly nasazeny do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) v množství  $2 \times 10^5$  buněk na jamku a byly stimulovány v celkovém objemu 400  $\mu$ l kompletního RPMI.

Monocyty, získané z PBMC nasazených do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) v množství  $2 \times 10^5$  buněk na jamku, byly stimulovány v celkovém objemu 200  $\mu$ l kompletního RPMI média.

PBMC a monocyty byly stimulovány gliadinem (24 hod, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 50, 100 a 250  $\mu$ g/ml. Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu, jako pozitivní kontrola byly použity buňky inkubované s LPS o výsledné koncentraci 100 ng/ml.

Ve vybraných pokusech byly lidské PBMC nejprve 1 hodinu preinkubovány (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) s neutralizační protilátkou proti lidskému TLR2 (konc. 10  $\mu$ g/ml) nebo TLR4 (konc. 10  $\mu$ g/ml), nebo následujícími inhibitory: SB203580 (konc. 10  $\mu$ M), SP600125 (konc. 20  $\mu$ M), UO126 (konc. 10  $\mu$ M), TPCK (konc. 25  $\mu$ M), Z-YVAD-fmk (konc. 10  $\mu$ M), quinidine (konc. 100  $\mu$ M), KN-62 (konc. 10  $\mu$ M), glybenclamide (konc. 100  $\mu$ M), N-Acetyl-L-cystein (NAC, konc. 30 mM), nebo byly inkubovány v kompletním RPMI médiu s 50 mM KCl. Následně byl přidán gliadin o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml a buňky byly inkubovány 24 hodin (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Jako kontrola sloužily buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu, buňky inkubované v kompletním RPMI médiu s inhibitory bez následné stimulace gliadinem a buňky inkubované v kompletním RPMI médiu s DMSO, které bylo přidáno ve stejném objemu jako byly dávány jednotlivé inhibitory, neboť inhibitory byly rozpuštěny právě v DMSO (s výjimkou NAC, který byl rozpuštěn ve vodě).

Po 24 hodinách byly od buněk odebrány supernatanty na analýzu cytokinové sekrece ELISA testem. Supernatanty byly uloženy v -80 °C.

Myší BMDC byly nasazeny do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) v množství  $1 \times 10^6$  buněk na jamku a byly stimulovány v celkovém objemu 1 ml kompletního RPMI média pro myší BMDC.

Myší BMDC byly stimulovány gliadinem (24 hod, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 50, 100 a 250  $\mu$ g/ml a na poslední 2,5 hodiny inkubace bylo přidáno ATP (výsledná konc. 2 mM). Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu pro myší BMDC a buňky inkubované



v kompletním RPMI médiu pro myší BMDC pouze s ATP, jako pozitivní kontrola byly použity buňky inkubované s LPS o výsledné koncentraci 100 ng/ml a buňky inkubované s LPS a ATP přidáním na poslední 2,5 hodiny stimulace.

V některých případech byly BMDC nejprve 1 hodinu preinkubovány (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) s inhibitorem Z-YVAD-fmk (konc. 10 μM), následně byl přidán gliadin o výsledné koncentraci 100 μg/ml a buňky byly inkubovány 24 hodin (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), kdy na poslední 2,5 hodiny inkubace bylo přidáno ATP (výsledná konc. 2 mM). Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu pro myší BMDC a buňky inkubované v kompletním RPMI médiu pro myší BMDC pouze s ATP, dále buňky inkubované v kompletním RPMI médiu pro myší BMDC s inhibitorem Z-YVAD-fmk bez následné stimulace gliadinem a buňky inkubované v kompletním RPMI pro myší BMDC médiu s DMSO.

Po 24 hodinách byly od buněk odebrány supernatanty na analýzu cytokinové sekrece ELISA testem. Supernatanty byly uloženy v -80 °C.

Optimální délka stimulace a koncentrace použitých látek byly vybrány z provedené časové a koncentrační kalibrace. Pro vyloučení negativního vlivu použitých inhibitorů na životnost buněk bylo provedeno ověření životnosti buněk na průtokovém cytometru.

#### **4.2.3.2 ELISA test**

Sekrece IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  lidskými PBMC a monocyty byla stanovena pomocí kitu ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe (BioLegend, USA), který již obsahoval všechny roztoky na ředění protilátek a vzorků, blokovací roztok a substrátový roztok (složení nebylo výrobcem uvedeno). Do každé jamky 96 jamkové destičky (NUNC MaxiSorp, Thermo Scientific, USA) bylo napipetováno 100 μl protilátky (Capture) naředěné 1 : 200 v ředícím roztoku (Coating Buffer) a destička se nechala inkubovat přes noc při 4 °C. Destička byla čtyřikrát promyta 300 μl promývacího roztoku na jamku a následně byla při pokojové teplotě 1 hodinu blokována 200 μl blokovacího roztoku na jamku (Assay Diluent). Všechny jamky destičky byly opět čtyřikrát promyty promývacím roztokem a následně bylo nanášeno 100 μl vzorků a standardu na jamku. Destička se vzorky byla inkubována 3 hodiny ve 37 °C. Poté byla destička čtyřikrát promyta a nechala se 1 hodinu při pokojové teplotě inkubovat se 100 μl detekční protilátky značené biotinem na jamku, ředěné 1 : 200 v ředícím roztoku (Assay Diluent). Destička byla opět čtyřikrát promyta a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě se 100 μl roztoku avidinu konjugovaného

s křenovou peroxidázou na jamku, ředěného 1 : 1000 v ředícím roztoku (Assay Diluent). Destička byla pětikrát promyta a následně bylo do každé jamky nanášeno 100 µl substrátového roztoku (Substrate solution). Reakce byla zastavena přidáním 100 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance vzorků a standardu byla změřena při 450 nm (ELx800™, BioTek, USA). Naměřené hodnoty byly zpracovány s použitím Gen5 softwaru.

Sekrece TNF-α lidskými PBMC byla stanovena pomocí kitu DuoSet Human TNF-α (R&D Systems). Do všech jamek 96 jamkové destičky (NUNC MaxiSorp, Thermo Scientific, USA) bylo napipetováno 100 µl protilátky (Capture) naředěné v PBS na koncentraci 4,0 µg/ml a destička se nechala inkubovat přes noc při pokojové teplotě. Druhý den byla destička promyta třikrát 400 µl promývacího roztoku na jamku a následně byla blokována 300 µl ředícího roztoku na jamku 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla destička třikrát promyta a do jednotlivých jamek bylo nanášeno 100 µl vzorku a standardu. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě, třikrát promyta a při laboratorní teplotě 2 hodiny inkubována se 100 µl detekční protilátky na jamku, naředěné v ředícím roztoku na koncentraci 350 ng/ml. Následně byla destička třikrát promyta a do každé jamky bylo přidáno 100 µl roztoku streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou, ředěného 1 : 200 v ředícím roztoku. Destička byla inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po třech promytí bylo do každé jamky nanášeno 100 µl substrátového roztoku. Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance vzorků a standardu byla změřena při 450 nm (ELx800™, BioTek, USA). Naměřené hodnoty byly zpracovány s použitím Gen5 softwaru.

Sekrece IL-1β myšími BMDC byla stanovena pomocí kitu ELISA MAX™ Standard (BioLegend, USA). Do všech jamek 96 jamkové destičky (NUNC MaxiSorp, Thermo Scientific, USA) bylo napipetováno 100 µl protilátky (Capture) naředěné 1 : 200 v uhličitanovém pufru a destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Destička byla čtyřikrát promyta 300 µl promývacího roztoku na jamku a následně byla při pokojové teplotě 1 hodinu blokována 200 µl ředícího roztoku na jamku. Destička byla čtyřikrát promyta a do každé jamky bylo nanášeno 100 µl vzorku nebo standardu. Po 2 hodinové inkubaci při pokojové teplotě byla destička čtyřikrát promyta a do jednotlivých jamek bylo přidáno 100 µl detekční protilátky značené biotinem na jamku, ředěné 1 : 200 v ředícím roztoku. Destička byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě a poté opět čtyřikrát promyta a inkubována 30 minut při pokojové teplotě se 100 µl roztoku avidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou na jamku, ředěného 1 : 1000 v ředícím roztoku. Destička byla pětikrát promyta a následně bylo do každé jamky nanášeno 100 µl

substrátového roztoku. Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance vzorků a standardu byla změřena při 450 nm (ELx800™, BioTek, USA). Naměřené hodnoty byly zpracovány s použitím Gen5 softwaru.

#### **4.2.4 Stanovení proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a Western blotu**

##### **4.2.4.1 Stimulace buněk**

Lidské PBMC a myší BMDC byly nasazeny do 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) v koncentraci 1 x 10<sup>6</sup> buněk/ml příslušného kompletního RPMI média.

Lidské PBMC byly nejprve 1 hodinu preinkubovány (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) s následujícími inhibitory: SB203580 (konc. 10  $\mu$ M), SP600125 (konc. 20  $\mu$ M), UO126 (konc. 10  $\mu$ M), TPCK (konc. 25  $\mu$ M), Z-YVAD-fmk (konc. 10  $\mu$ M), quinidine (konc. 100  $\mu$ M), KN-62 (konc. 10  $\mu$ M), glybenclamide (konc. 100  $\mu$ M), NAC, (konc. 30 mM), nebo byly inkubovány v kompletním RPMI médiu s 50 mM KCl, následně byl přidán gliadin o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml a buňky byly inkubovány 24 hodin (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Jako kontrola sloužily buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu a buňky inkubované v kompletním RPMI médiu s inhibitory bez následné stimulace gliadinem.

Myší BMDC byly stimulovány 24 hodin gliadinem o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Jako kontrola sloužily buňky inkubované pouze v kompletním RPMI médiu pro BMDC. Následně byly odebrány buněčné supernatanty (uloženy do -80 °C) a z buněk byly připraveny buněčné lyzáty.

Optimální délka stimulace a koncentrace použitých látek byly vybrány z provedené časové a koncentrační kalibrace. Pro vyloučení negativního vlivu použitých inhibitorů na životnost buněk bylo provedeno ověření životnosti buněk na průtokovém cytometru.

##### **4.2.4.2 Příprava buněčných lyzátů**

K přípravě celobuněčných lyzátů z lidských PBMC byl použit kit Nuclear Extract Kit (Aktive Motif, Belgie), který obsahoval inhibitor fosfatáz, PBS, lyzační pufr, dithiothreitol (DTT) a inhibitor proteáz (složení roztoků nebylo výrobcem uvedeno).

24 jamková destička s PBMC (s již odebranými supernatanty) byla umístěna na led a do každé jamky byl přidán 1 ml chlazeného roztoku PBS/inhibitor fosfatáz. Buňky

byly seškrabány a přeneseny do vychlazených zkumavek. Jamky byly opláchnuty 0,5 ml roztoku PBS/inhibitor fosfatáz, který byl přidán k buňkám do zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány (10 min, 1200 rpm, 4 °C). Po odstranění veškerého supernatantu byly buňky resuspendovány ve 30 µl chlazeného kompletního lyzačního pufru (lyzační pufr, 100 mM DTT, 1 % (v/v) inhibitor proteáz) na  $1 \times 10^6$  PBMC. Poté byla suspenze vortexována, 15 minut ponechána třepat na ledu, následně opět vortexována (30 s) a 10x protažena inzulinovou stříkačkou s jehlou (0,33 x 12 mm) (Chirana, ČR). Nakonec byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 20 min, 4 °C) a supernatanty (celobuněčné lyzáty) sebrány a uloženy do -80 °C.

Pro přípravu celobuněčných lyzátů z myších BMDC byl použit lyzační pufr – Cell Lysis Buffer (10x) (Cell Signaling Technology, USA). 10x koncentrovaný lyzační pufr byl naředěn vodou na 1x koncentrovaný a doplněn o PMSF (výsledná konc. 1 mM) a inhibitor proteáz (1 %, v/v) (Aktive Motif, Belgie). Výrobce uvedené složení 1x koncentrovaného lyzačního pufru: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM pyrofosfát sodný, 1 mM β-glycerofosfát, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptin.

24 jamková destička s BMDC (s již odebranými supernatanty) byla umístěna na led a do každé jamky byl přidán 1 ml chlazeného roztoku PBS/inhibitor fosfatáz (Aktive Motif, Belgie). Buňky byly seškrabány a přeneseny do vychlazených zkumavek. Jamky byly opláchnuty 0,5 ml roztoku PBS/inhibitor fosfatáz, který byl přidán k buňkám do zkumavek. Po centrifugování zkumavek (10 min, 1200 rpm, 4 °C) a odstranění veškerého supernatantu byly buňky resuspendovány ve 40 µl chlazeného kompletního lyzačního pufru (1x konc. lyzační pufr, 1 mM PMSF, 1 % (v/v) inhibitor proteáz) na  $1 \times 10^6$  BMDC. Následně byly vzorky vortexovány, 10 minut ponechány třepat na ledu a krátce sonikovány. Nakonec byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 20 min, 4 °C) a supernatanty (celobuněčné lyzáty) sebrány a uloženy do -80 °C.

#### **4.2.4.3 Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla stanovena metodou BCA, s použitím kitu BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA), který obsahoval všechny roztoky a standard. Metoda je založena na redukci měďnatých iontů na měďné bílkoviny. Sůl kyseliny bicinchoninové (BCA) následně měďné ionty chelatuje za vzniku červeného zbarvení. Činidlo přidávané k stanovovaným vzorkům se připravuje

smísením roztoku A (roztok soli BCA) a roztoku B (roztok síranu měďnatého), a to v objemovém poměru 50 (A) : 1 (B). Stanovení se provádí spektrofotometricky.

Do 96 jamkové destičky (GAMA, ČR) bylo k 10  $\mu$ l vzorku a standardu (ředící řada BSA o koncentraci v rozmezí 31,35–2000  $\mu$ g/ $\mu$ l) přidáno 200  $\mu$ l činidla připraveného z roztoků A a B a destička se nechala 30 minut inkubovat při 37 °C. Poté byla změřena absorbance vzorků a standardu při 562 nm (ELx800™, BioTek, USA). Naměřené hodnoty byly zpracovány s použitím Gen5 softwaru.

#### **4.2.4.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

Z buněčných lyzátů připravených z lidských PBMC a myších BMDC byl odebrán takový objem vzorku, aby všechny obsahovaly stejné množství bílkovin (10  $\mu$ g u lyzátů z lidských PBMC, 20  $\mu$ g u myších BMDC). Ze supernatantů, odebraných od buněk před jejich lyzováním, bylo odebráno vždy 20  $\mu$ l. Odebrané vzorky byly před nanesením na polyakrylamidový gel smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrem pro SDS-PAGE, v objemovém poměru 5 dílů vzorku na 1 díl 5x koncentrovaného vzorkového pufru, 5 minut zahřáty na 100 °C a krátce centrifugovány. Vzorky a standard byly naneseny na gel, sestávající z 5% zaostřovacího gelu a 5-20% gradientového separačního gelu. Elektroforéza (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad, USA) probíhala v prostředí Tris-glycinového pufru, při nastaveném konstantním proudu 35 mA na dva gely. Rozmístění proteinů v gelu bylo vizualizováno obarvením gelu v barvicím roztoku pro SDS-PAGE s Coomassie Brilliant Blue G250.

#### **4.2.4.5 Western Blot**

Proteiny z buněčných lyzátů a buněčných supernatantů rozdělené v gelu pomocí SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (GE Healthcare, Velká Británie) metodou Western blot v uspořádání wet-blotting (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad, USA). Do kazety byly poskládány všechny složky sendviče (předem namočené v blotovacím pufru): porézní houbičky, dva filtrační papíry, membrána, gel, dva filtrační papíry a porézní houbička. Kazeta byla umístěna do blotovacího tanku a zalita blotovacím pufrům. Přenos proteinů na membránu probíhal 1 hodinu při nastaveném konstantním proudu 250 mA. Poté byla membrána vyjmuta a opláchnuta roztokem TBST. Pro kontrolu přenosu proteinů byla membrána obarvena roztokem Ponceau S. Membrána byla následně opláchnuta destilovanou vodou a zbylý roztok Ponceau S byl vymyt třepáním membrány v TBST. Membrána byla 1 hodinu při pokojové teplotě blokována 5% (w/v) roztokem

odtučněného mléka v TBST. Poté byla membrána třikrát promyta intenzivním třepáním v TBST (10 min, pokojová teplota) a inkubována přes noc při 4 °C za stálého třepání s 10 ml primární protilátky ředěné v 5% roztoku BSA v TBST, konkrétní ředění protilátek je uvedeno v tabulce 1. Druhý den byla membrána promyta třepáním v TBST (10 min, pokojová teplota) a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou v 5% roztoku odtučněného mléka v TBST, konkrétní ředění je uvedeno v tabulce 1.

Pro vizualizaci proteinů s navázanou primární a sekundární protilátkou byl použit chemiluminiscenční substrát (Super signal west femto max. sensitivity substráte, Thermo Scientific, USA). Signál byl detekován na přístroji LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System, Fuji, Japonsko) a následně byl analyzován v programu AIDA 1000/1D Image Analyzer software, verze 3.28.

V některých případech byla membrána regenerována 15 ml regeneračního pufru na membrány – Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, USA) (20 min, pokojová teplota) a po promytí intenzivním třepáním v TBST (10 min, pokojová teplota) blokována a následně inkubována s jinou primární protilátkou.

Tab. 1: Ředění protilátek na Western blot

| Primární protilátky  |                             |
|--|-----------------------------|
| Protilátka proti:  | Ředění v 5%<br>BSA v TBST   |
| Lidskému IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (R&D Systems)                        | 1 : 500                     |
| Lidskému štěpenému IL-1 $\beta$ (D116) (Cell Signaling Technology) | 1 : 1000                    |
| Lidské kaspáze-1 (A-19) (Santa Cruz Biotechnology)                 | 1 : 1000                    |
| Podjednotce p10 lidské kaspázy-1 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology) | 1 : 200                     |
| Myšímu IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (R&D Systems)                          | 2 $\mu$ g/ml                |
| Beta-aktinu (Abcam)  | 1 : 1000                    |
| Sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou           |                             |
| Protilátka proti:  | Ředění v 5%<br>mléku v TBST |
| Myšímu IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch)                          | 1 : 20 000                  |
| Králičímu IgG (H+L) (Cell Signaling Technology)                    | 1 : 20 000                  |
| Krysímu IgG (H+L) (Cell Signaling Technology)                      | 1 : 3000                    |

## 4.2.5 Stanovení aktivace kaspázy-1 průtokovou cytometrií

### 4.2.5.1 Stimulace buněk

Dno jamek 24 jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) bylo potaženo 4% roztokem polyHEMA v ethanolu, aby se zabránilo adhezenci buněk. Do každé jamky bylo nasazeno  $5 \times 10^5$  lidských PBMC v 0,5 ml kompletního RPMI média. Buňky byly stimulovány 16 hod (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gliadinem o výsledné koncentraci koncentraci 100 µg/ml. Následně byly zpracovány pro analýzu průtokovou cytometrií. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v RPMI médiu.

Optimální délka stimulace byla vybrána z provedené časové kalibrace.

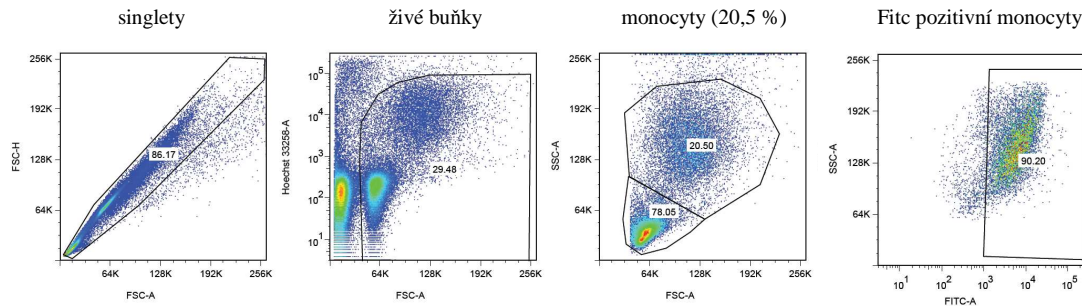
### 4.2.5.2 Analýza průtokovou cytometrií

Ke stanovení aktivace kaspázy-1 průtokovou cytometrií byl použit Green FLICA™ Caspase 1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies, USA), který obsahuje fluorescenčně značený inhibitor kaspázy-1, FAM-YVAD-fmk. Inhibitor je schopný prostupovat buněčnou membránou a v buněčném cytozolu se kovalentně vázat na aktivní kaspázu-1. Nenavázaný inhibitor difunduje z buňky a následně je odmyt. Změřený fluorescenční signál tak odpovídá množství aktivní kaspázy-1 v buňce v době přidání inhibitoru.

Lidské PBMC byly po stimulaci sebrány z 24 jamkové destičky, dno jamek bylo opláchnuto 0,5 ml kompletního RPMI média, které bylo přidáno k sebraným buňkám. Po centrifugaci (10 min, 4 °C, 1200 rpm) byly buňky ponechány v 290 µl kompletního RPMI média, zbytek byl odstraněn. Následně byly buňky inkubovány 1 hodinu ve tmě (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) s 30x koncentrovaným roztokem Green FLICA™ (ImmunoChemistry Technologies, USA). Během inkubace byla buněčná suspenze dvakrát promíchána. Po inkubaci byly buňky přeneseny na led, dvakrát promyty 1 ml promývacího roztoku (Wash Buffer, obsažený v kitu) a centrifugovány (10 min, 4 °C, 1200 rpm). Poté byly buněčné pelety resuspendovány ve 100 µl PBS, do vybraných jamek bylo přidáno 10 µl Hoechst 33258 barvy, pro rozlišení živých a mrtvých buněk, a aktivace kaspázy-1 byla stanovena průtokovou cytometrií (LSR II, BD Biosciences, USA). Data byla analyzována FlowJo softwarem, a to následujícím způsobem (obr. 10).

Nejprve byly ze všech naměřených dat vybrány pouze ty, které odpovídaly singletovým buňkám (vybíráno ve vynesení forward scatter height (FSC-H) proti forward scatter area (FSC-A)), ze singletových buněk byly dále vybrány pouze živé buňky, tj.

Hoechst 33258 negativní, (vybíráno ve vynesení Hoechst 33258 proti FSC-A). Z živých buněk byly vybrány monocyty (vybíráno dle side scatter area (SSC-A) proti FSC-A). U vybrané populace singletových živých monocytů byla analyzována míra aktivace kaspázy-1 (vybíráno dle negativní kontroly, tj. buněk inkubovaných bez fluorescenčně značeného inhibitoru kaspázy-1, ve vynesení SSC-A proti FITC-A).



**Obr. 10: Výběr buněk při stanovení aktivace kaspázy-1 průtokovou cytometrií.**



## 5 Výsledky

### 5.1 Gliadin indukuje sekreci IL-1 $\beta$ a IL-1 $\alpha$ z PBMC a monocytů získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií

Již dříve bylo ukázáno, že gliadin štěpený pepsinem a trypsinem indukuje sekreci IL-1 $\beta$  z PBMC a monocytů (Harris *et al.*, 2008). Pro ověření těchto výsledků byly izolovány PBMC a monocyty (4.2.2.1 a 4.2.2.2) z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií a zdravých dárců a stimulovány různými koncentracemi (50, 100 a 250  $\mu\text{g/ml}$ ) štěpeného gliadinu (4.2.1) po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky stimulované LPS (100 ng/ml). Následně bylo v buněčných supernatantech stanoveno množství sekretovaného IL-1 $\beta$ , k tomuto účelu byl použit ELISA test (4.2.3).

Jak ukazuje obr. 11 A, PBMC a monocyty pacientů i zdravých dárců kultivované pouze v médiu (bez stimulace gliadinem) sekretovaly nepatrná množství IL-1 $\beta$ . Stimulace štěpeným gliadinem vedla k výrazně vyšší sekreci IL-1 $\beta$  z PBMC a monocytů získaných z krve celiaků na rozdíl od buněk zdravých dárců, u kterých bylo po stimulaci štěpeným gliadinem zjištěno pouze mírné zvýšení sekrece IL-1 $\beta$ . Rozdíly v množství sekretovaného IL-1 $\beta$  u buněk stimulovaných různými koncentracemi štěpeného gliadinu nebyly příliš výrazné. Gliadinem indukovaná sekrece IL-1 $\beta$  u monocytů a PBMC získaných z krve celiaků byla srovnatelná.

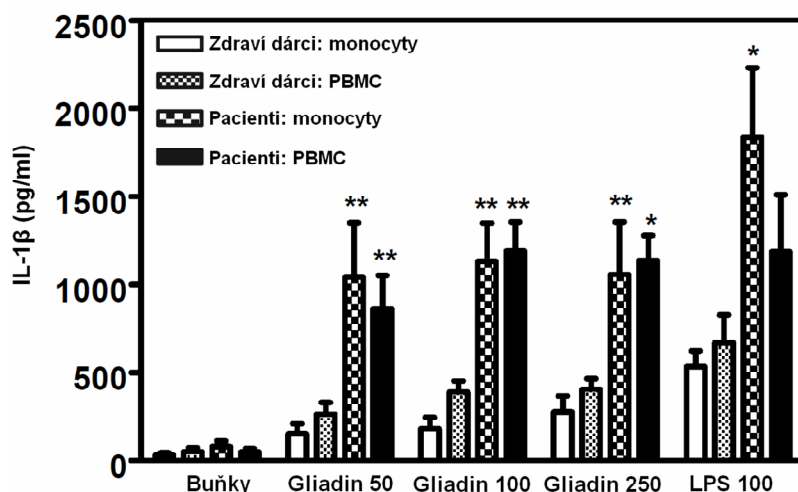
V buněčných supernatantech bylo ELISA testem (4.2.3) stanoveno také množství IL-1 $\alpha$  (výsledky jsou shrnuty na obr. 11 B). Buňky kultivované pouze v médiu nesekretovaly téměř žádný IL-1 $\alpha$ , po stimulaci štěpeným gliadinem byly naměřeny mírně vyšší hodnoty IL-1 $\alpha$  v buněčných supernatantech od PBMC zdravých dárců a signifikantně vyšší hodnoty v buněčných supernatantech od PBMC pacientů s celiakií. Přitom vyšší sekrece IL-1 $\alpha$  byla stanovena v buněčných supernatantech od PBMC než od monocytů. Sekrece IL-1 $\alpha$  vykazovala mírnou závislost na koncentraci štěpeného gliadinu použitého při stimulaci buněk.

Zároveň byla stanovena vyšší koncentrace obou cytokinů v buněčných supernatantech od PBMC a monocytů pacientů s celiakií po stimulaci LPS oproti hodnotám naměřeným u zdravých dárců.

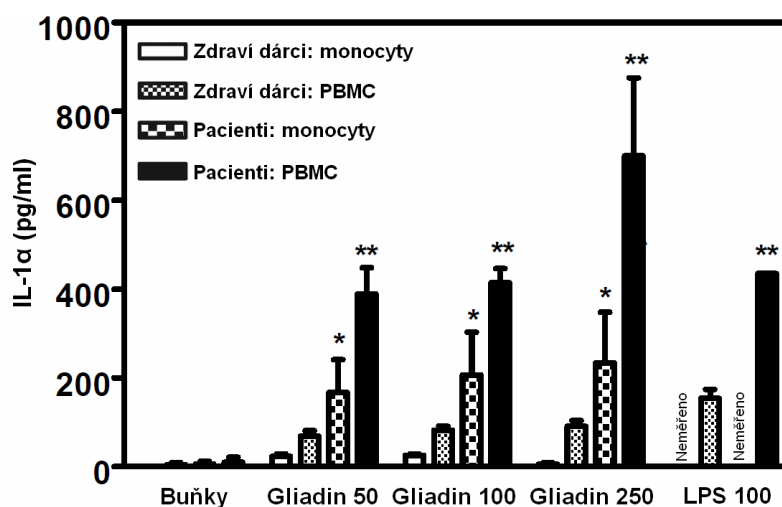
Tyto výsledky potvrzují dříve publikovaná data, že gliadin u PBMC a monocytů získaných z krve celiaků indukuje sekreci IL-1 $\beta$  na rozdíl od PBMC a monocytů získaných z krve zdravých dárců. Navíc jsme zde ukázali, že gliadin u PBMC a monocytů

získaných z krve celiaků na rozdíl od PBMC a monocytů získaných z krve zdravých dárců indukuje také sekreci IL-1 $\alpha$ . Protože hodnoty IL-1 $\beta$  sekretovaného z gliadinem stimulovaných monocytů a PBMC pacientů s celiakií byly srovnatelné, byly v dalších pokusech nadále používány pouze PBMC.

A



B



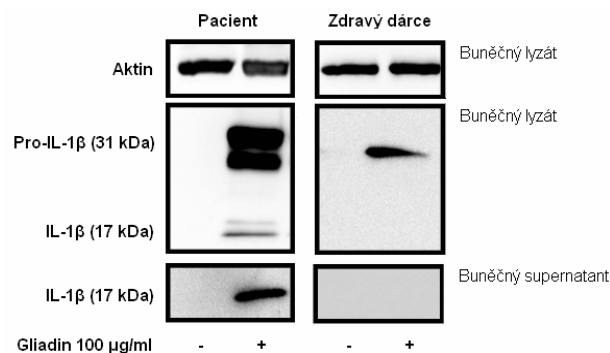
**Obr. 11: Gliadin indukuje sekreci IL-1 $\beta$  a IL-1 $\alpha$  z PBMC a monocytů získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií.** PBMC a monocyty izolované z krve celiaků a zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 50, 100 a 250  $\mu$ g/ml po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu bez gliadinu a buňky stimulované LPS (100 ng/ml). V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  (A) a IL-1 $\alpha$  (B) pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota střední chyby průměru (SEM) ze stimulací buněk 35 pacientů s celiakií a 10 zdravých dárců. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk pacientů oproti zdravým dárcům je vyjádřena jako \* nebo \*\*, kde \* odpovídá  $P < 0,05$ ; \*\* odpovídá  $P < 0,01$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).

## 5.2 Gliadin indukuje expresi a maturaci pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií

Protože IL-1 $\beta$  se v buňkách neexprimuje konstitutivně (Dinarello, 1996), měla by být zvýšená sekrece IL-1 $\beta$ , pozorovaná po stimulaci gliadinem, spojená se zvýšenou expresí a maturací pro-IL-1 $\beta$  v buňce. Tento předpoklad jsme ověřili pomocí metody Western blot (4.2.4).

PBMC izolované z krve pacientů s celiakií a zdravých dárců byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml) a následně z nich byly připraveny celobuněčné lyzáty. Proteiny obsažené v lyzátech byly rozděleny na polyakrylamidové elektroforéze a přeneseny na nitrocelulózovou membránu, která byla inkubována s protilátkou proti IL-1 $\beta$  rozeznávající jak prekurzorovou, tak štěpenou formu IL-1 $\beta$ . Podobně byla specifickou protilátkou pouze proti štěpené formě IL-1 $\beta$  detekována tato štěpená forma v supernatantech odebraných od stimulovaných buněk.

Podle předpokladů se potvrdilo, že štěpený gliadin indukoval expresi a maturaci pro-IL-1 $\beta$ , a to v lyzátech připravených z PBMC pacientů s celiakií, kde byla detekována jak prekurzorová forma (pro-IL-1 $\beta$ , 31 kDa), tak štěpená forma (17 kDa). V supernatantech potom byla detekována štěpená forma (obr. 12). V lyzátech z PBMC zdravých dárců naopak bylo detekováno pouze malé množství pro-IL-1 $\beta$ , štěpená forma nebyla detekována ani v lyzátech ani buněčných supernatantech (obr. 12).



**Obr. 12: Gliadin indukuje expresi a maturaci pro-IL-1 $\beta$  u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií.** PBMC izolované z krve celiaků a zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml po 24 hodin. Přítomnost pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech byla detekována použitím specifické protilátky proti maturované i nematurované formě IL-1 $\beta$ . Sekretovaná štěpená forma IL-1 $\beta$  v buněčných supernatantech byla detekována pomocí specifické protilátky proti maturované formě IL-1 $\beta$ . Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek z 5 nezávislých experimentů.

### **5.3 Maturace pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií stimulovaných gliadinem je zprostředkována kaspázou-1**

Je známo, že kaspáza-1 je jeden z proteinů, který může zajišťovat maturaci pro-IL-1 $\beta$  na jeho aktivní formu (Thornberry *et al.*, 1992). Proto byla v následujícím kroku ověřena účast kaspázy-1 v maturaci pro-IL-1 $\beta$ , jehož exprese byla vyvolána gliadinem, a dále schopnost gliadinu indukovat aktivaci kaspázy-1.

Nejprve byla zkoumána účast kaspázy-1 v maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  použitím specifického inhibitoru kaspázy-1, Z-YVAD-fmk. Tento inhibitor se váže do aktivního místa kaspázy-1, a tím brání vazbě a štěpení pro-IL-1 $\beta$ . PBMC získané z periferní krve pacientů s celiakií byly proto nejprve inkubovány s inhibitorem Z-YVAD-fmk (o koncentraci 10  $\mu$ M) po dobu 1 hodiny a následně byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml). V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  ELISA testem (4.2.3). Jak je ukázáno na obr. 13 A, preinkubace PBMC s inhibitorem Z-YVAD-fmk inhibovala sekreci IL-1 $\beta$  u buněk stimulovaných gliadinem, ale neměla vliv na sekreci IL-1 $\alpha$  a TNF- $\alpha$ , které nejsou kaspázou-1 maturovány.

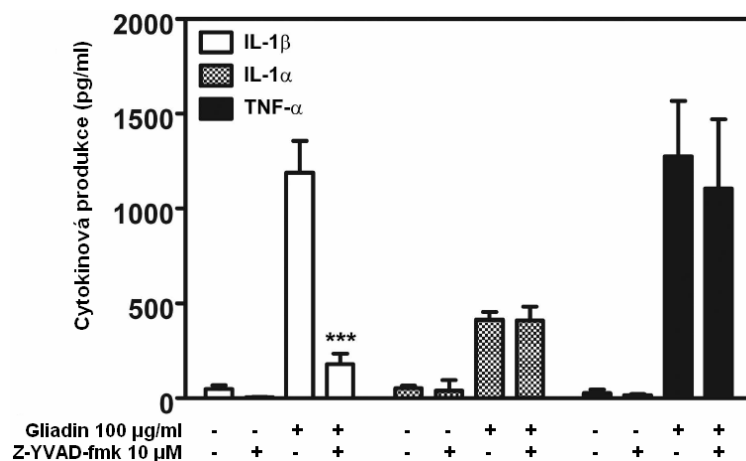
Tyto výsledky byly potvrzené také metodou Western blot (4.2.4). I v tomto případě byly PBMC získané z krve pacientů s celiakií a zdravých dárců preinkubovány s inhibitorem kaspázy-1, Z-YVAD-fmk, (o koncentraci 10  $\mu$ M) po dobu 1 hodiny a následně byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml). Poté byly v lyzátech specifickou protilátkou detekovány pro-IL-1 $\beta$  a maturovaný IL-1 $\beta$  a v buněčných supernatantech maturovaná forma IL-1 $\beta$ . Jak ukazuje obr. 13 B, v lyzátech z PBMC získaných z krve pacientů s celiakií preinkubace s inhibitorem Z-YVAD-fmk snížila množství detekované maturované formy IL-1 $\beta$ , aniž by měla výrazný vliv na expresi pro-IL-1 $\beta$ . Pokud byly PBMC před stimulací štěpeným gliadinem preinkubovány s inhibitorem Z-YVAD-fmk, bylo v buněčných supernatantech detekováno výrazně nižší množství maturované formy IL-1 $\beta$ .

U PBMC zdravých dárců bylo detekováno pouze malé množství pro-IL-1 $\beta$  bez výrazného vlivu Z-YVAD-fmk na jeho expresi. Štěpená forma nebyla detekována ani v lyzátech ani buněčných supernatantech, jak ukazuje obr. 13 B.

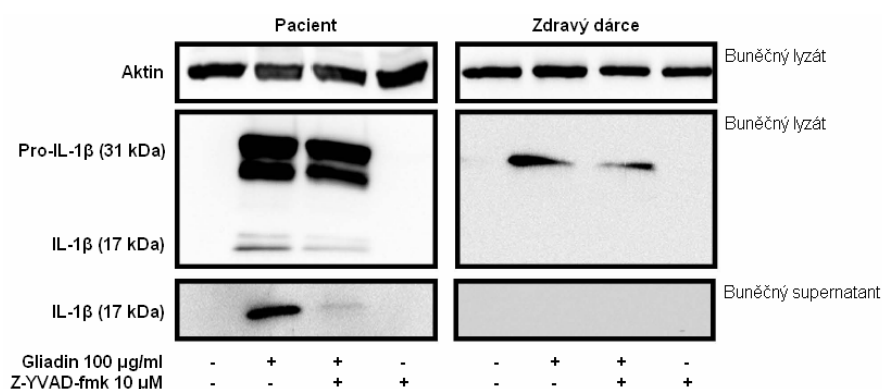
Mírně snížená exprese pro-IL-1 $\beta$  po působení inhibitoru Z-YVAD-fmk u buněk pacientů i zdravých dárců stimulovaných gliadinem je pravděpodobně způsobena tím, že inhibitor Z-YVAD-fmk brání maturaci pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$ , tudíž není tato aktivní forma

ani sekretována a nemůže docházet k parakrinní a autokrinní signalizaci přes receptor IL-1R, která u buněk také aktivuje expresi pro-IL-1 $\beta$ .

**A**



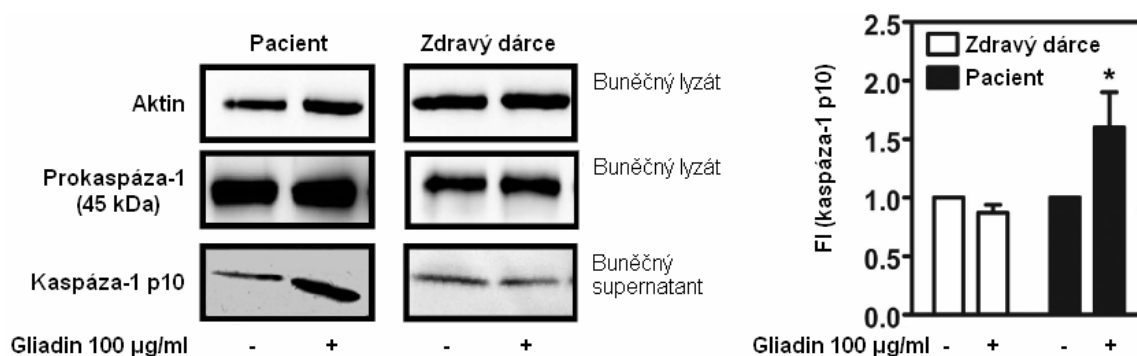
**B**



**Obr. 13: Maturace pro-IL-1 $\beta$  u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií stimulovaných gliadinem je zprostředkována kaspázou-1.** PBMC izolované z krve celiaků byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml po 24 hodin, některé vzorky byly preinkubovány s inhibítorem kaspázy-1, Z-YVAD-fmk, o koncentraci 10  $\mu$ M. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s inhibítorem Z-YVAD-fmk bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  a TNF- $\alpha$  pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM získané stimulací buněk 10 pacientů s celiakií a 10 zdravých dárců. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti buňkám stimulovaným štěpeným gliadinem v přítomnosti Z-YVAD-fmk je vyjádřena jako \*\*\*, kde \*\*\* odpovídá  $P < 0,001$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) Maturace pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech byla detekována použitím specifické protilátky proti maturované i nematurované formě IL-1 $\beta$  a sekretovaná štěpená forma IL-1 $\beta$  v buněčných supernatantech byla detekována pomocí specifické protilátky proti maturované formě IL-1 $\beta$  metodou Western blot. Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek z 5 nezávislých experimentů.

Protože kaspáza-1 je aktivní pouze pokud dojde k samoštěpení její neaktivní formy, tj. zymogenu prokaspázy-1 (45 kDa), na heterodimer složený ze dvou 10 kDa a dvou 20 kDa podjednotek (Thornberry *et al.*, 1992), byla dále určena schopnost gliadinu aktivovat kaspázu-1.

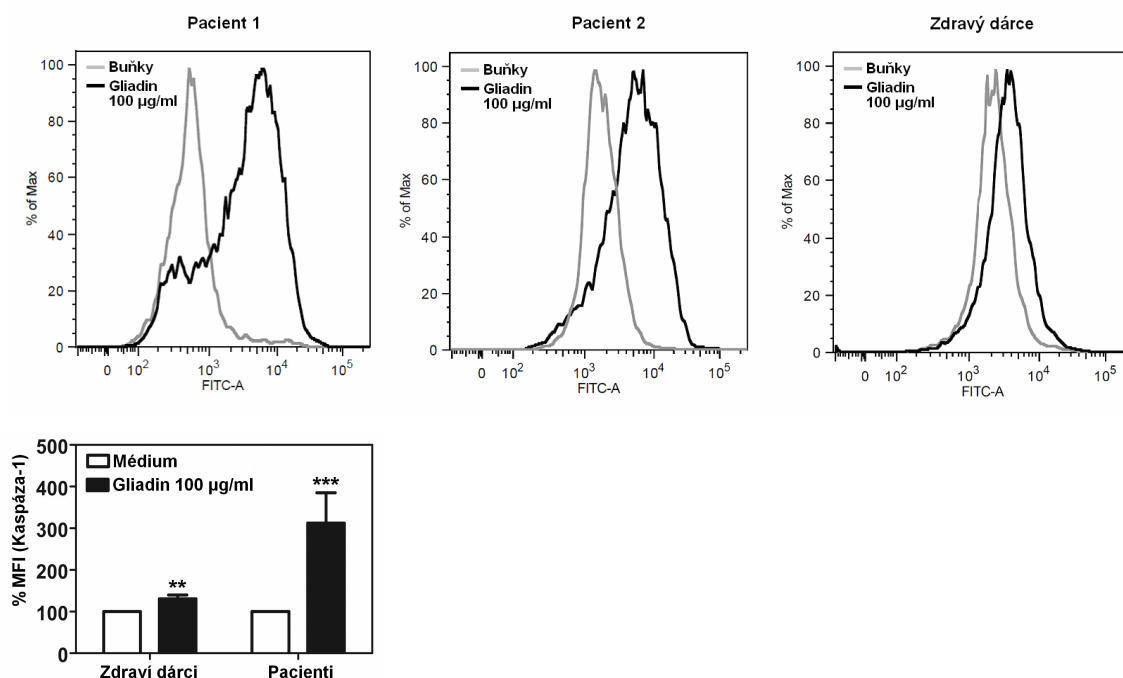
Aktivace kaspázy-1 účinkem gliadinu byla stanovena metodou Western blot (4.2.4). PBMC získané z krve pacientů s celiakií a zdravých dárců byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml). Poté byla v připravených lyzátech detekována specifickou protilátkou kaspáza-1 ve formě neaktivního zymogenu, prokaspázy-1, a v buněčných supernatantech byla specifickou protilátkou detekovaná 10 kDa podjednotka kaspázy-1, p10. Jak je vidět na obr. 14, již v buněčných supernatantech PBMC inkubovaných pouze v médiu je podjednotka p10 kaspázy-1 detekovatelná. Přesto účinkem gliadinu dochází k mírnému zvýšení jejího množství v buněčných supernatantech od PBMC z krve celiaků nikoli však v supernatantech od PBMC z krve zdravých dárců. Množství prokaspázy-1 se účinkem gliadinu nemění.



**Obr. 14: Gliadin indukuje aktivaci kaspázy-1.** PBMC izolované z krve celiaků a zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100 µg/ml po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu. Prokaspáza-1 v buněčných lyzátech a podjednotka p10 aktivní kaspázy-1 v buněčných supernatantech byly detekovány použitím specifických protilátek metodou Western blot. Detekce aktinu byla použita jako kontrola. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů. Získaná data byla dále analyzována v programu AIDA. Hodnoty signálu detekované podjednotky p10 aktivní kaspázy-1 v buněčných supernatantech PBMC stimulovaných gliadinem byly normalizovány na hodnoty signálu detekované podjednotky p10 v buněčných supernatantech buněk inkubovaných pouze v médiu. Graf zobrazuje průměrné hodnoty násobného zvýšení (FI) detekovaného množství podjednotky p10 kaspázy-1 u buněk stimulovaných gliadinem oproti buňkám inkubovaným pouze v médiu + hodnota SEM ze 3 nezávislých experimentů. Míra signifikance hodnot FI detekovaného množství podjednotky p10 kaspázy-1 u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti kontrolám je vyjádřena jako \*, kde \* odpovídá  $P < 0,05$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).

Dále byla aktivace kaspázy-1 účinkem gliadinu určena pomocí průtokové cytometrie (4.2.5). K tomuto účelu byl použit fluorescenčně značený inhibitor kaspázy-1, FAM-YVAD-fmk, který prostupuje buněčnou membránou a v buněčném cytozolu se kovalentně váže na aktivní kaspázu-1. PBMC získané z krve pacientů s celiakií a zdravých dárců byly 16 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml), poté byly buňky 1 hodinu inkubovány s fluorescenčně značeným inhibitorem kaspázy-1, FAM-YVAD-fmk a následně byly analyzovány na průtokovém cytometru. Jako kontrola byly použity buňky inkubované v médiu bez stimulace. Z výsledků vyplývá, že gliadin zvýšil u buněk pacientů s celiakií aktivaci kaspázy-1 v průměru o 220 % ± 73 % oproti kontrole. U buněk zdravých dárců zvýšila stimulace gliadinem aktivaci kaspázy-1 o 30 % ± 9 % oproti kontrole. Na obr. 15, jsou ukázány histogramy zobrazující posun fluorescenční intenzity (která odpovídá aktivaci kaspázy-1) monocytů stimulovaných gliadinem oproti kontrole a graf naměřených hodnot aktivace kaspázy-1 vyjádřených v procentech průměrné fluorescenční intenzity (MFI) + hodnota SEM.

Ze všech výše uvedených výsledků lze usoudit, že gliadin aktivuje kaspázu-1 a ta se poté podílí na maturaci pro-IL-1β u PBMC získaných z krve pacientů s celiakií.



**Obr. 15: Gliadin indukuje aktivaci kaspázy-1.** PBMC izolované z krve celiaků a zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100 µg/ml po 16 hodin. Jako kontrola byly použity buňky kultivované pouze v médiu. Aktivace kaspázy-1 byla následně analyzována na průtokovém cytometru.

Ukázán je reprezentativní histogram zobrazující posun fluorescenční intenzity monocytů stimulovaných gliadinem oproti kontrole od dvou pacientů s celiakií a od jednoho zdravého dárce. Graf znázorňuje průměr naměřených hodnot MFI v % + hodnota SEM v % získaných analýzou buněk 10 pacientů a 5 zdravých dárců. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti kontrolám je vyjádřena jako \*\* nebo \*\*\*, kde \*\* odpovídá  $P < 0,01$  a \*\*\* odpovídá  $P < 0,001$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).

#### **5.4 Produkce IL-1 $\beta$ indukovaná gliadinem u PBMC získaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií je závislá na uvolňování draselných iontů a produkci ROS**

Důležitým krokem v autokatalytické aktivaci kaspázy-1 je vytvoření velkého makromolekulárního komplexu – inflamazómu. Inflamazóm se v DC a makrofázích vyskytuje v neaktivní formě a pro svoji aktivaci (seskupování jednotlivých proteinů do komplexu) vyžaduje obdržení signálu. Mezi navrženými modely aktivace inflamazómu jsou mimo jiné vazba exogenního ATP na kanál P2X7, umožňující uvolňování draselných iontů z buňky, a zvýšená produkce ROS v buňce. I když v monocytech je kaspáza-1 přítomná již v aktivní formě, stále je její aktivita závislá na seskupení inflamazomových proteinů. Pro úspěšnou sekreci IL-1 $\beta$  z monocytů (stejně jako u DC a makrofágů) se zdá být nutná zvýšená hladina ROS a/nebo snížená hladina draselných iontů v buňce (Hewinson *et al.*, 2008; Netea *et al.*, 2009; Netea *et al.*, 2010; Tassi *et al.*, 2009).

Abychom určili, zda gliadinem vyvolaná sekrece IL-1 $\beta$  z PBMC pacientů s celiakií je závislá na snížení koncentrace draselných iontů v buňce, byly PBMC izolované z krve pacientů s celiakií stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu\text{g/ml}$ ) v médiu, jež obsahovalo 50 mM koncentraci draselných iontů (použit 50 mM KCl). Jak je ukázáno na obr. 16 A, v buněčných supernatantech od PBMC inkubovaných v médiu s 50 mM koncentrací draselných iontů byla ELISA testem (4.2.3) stanovena signifikantně nižší koncentrace IL-1 $\beta$  než u PBMC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem. Pro potvrzení těchto výsledků byly PBMC izolované z krve pacientů s celiakií před stimulací štěpeným gliadinem 1 hodinu preinkubovány s inhibitorem draselných kanálů – quinidinem (použitá koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ) a inhibitorem uvolňování draselných iontů a inflamazómu NLRP3 – glybenclamidem (použitá koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ). Jak je ukázáno na obr. 16 A, v buněčných supernatantech od PBMC inkubovaných v médiu s inhibitory quinidinem a glybenclamidem byla ELISA testem (4.2.3) stanovena také signifikantně nižší koncentrace IL-1 $\beta$  než u PBMC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem.

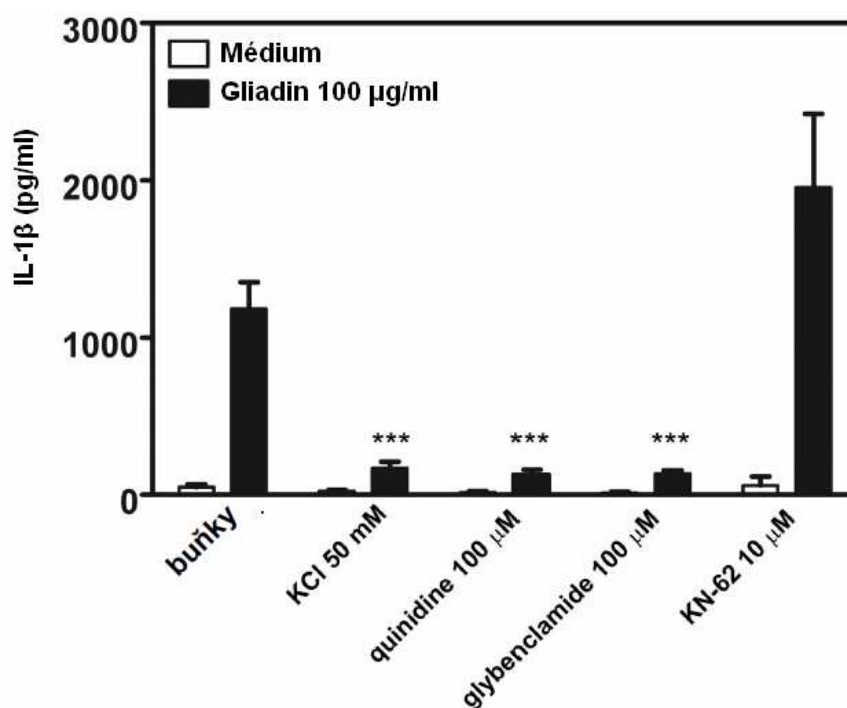


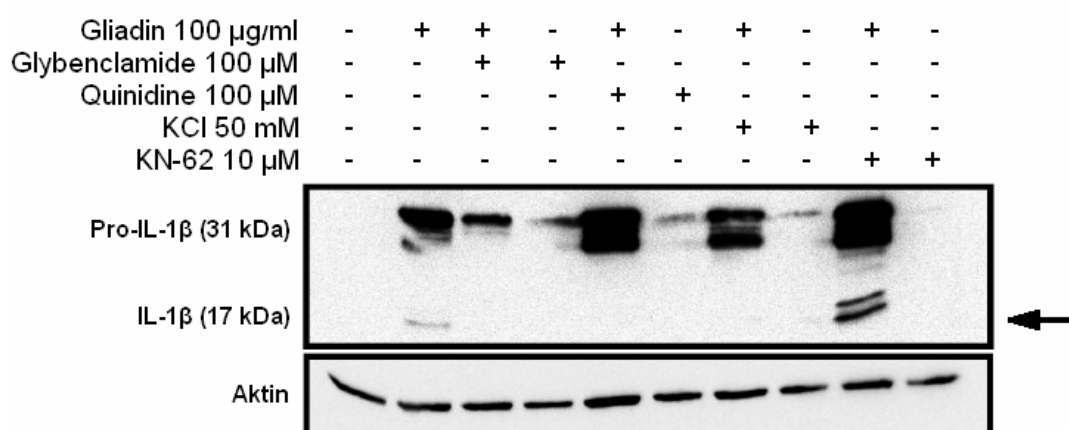
Protože bylo navrženo, že aktivace inflamazómu draselnými ionty u monocytů by mohla být způsobena uvolňováním endogenního ATP, které svojí vazbou na kanál P2X7 vyvolá jeho otevření, použili jsme inhibitor otevřeného kanálu P2X7, KN-62. Na rozdíl od výše uvedených inhibitorů nevedla prestimulace PBMC izolovaných z krve pacientů s celiakií s inhibitorem KN-62 (použitá koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ) ke snížení sekrece IL-1 $\beta$  vyvolané gliadinem (obr. 16 A).

Stejné výsledky byly získány i metodou Western blot (4.2.4). V lyzátech z PBMC vyzolovaných z krve celiaků, které byly nejprve 1 hodinu prestimulovány v médiu s KCl (použitá koncentrace 50 mM) nebo s inhibitory quinidinem (použitá koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ) a glybenclamidem (použitá koncentrace 100  $\mu\text{M}$ ) a následně 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu\text{g/ml}$ ), nebyla specifickou protilátkou detekována štěpená forma IL-1 $\beta$ . Ale v lyzátech z PBMC, které byly nejprve 1 hodinu prestimulovány s inhibitorem KN-62 (použitá koncentrace 10  $\mu\text{M}$ ) a následně byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu\text{g/ml}$ ), byla maturovaná forma IL-1 $\beta$  detekována (obr. 16 B).

Tyto výsledky ukazují, že uvolňování draselných iontů je nutné pro maturaci pro-IL-1 $\beta$  a sekreci IL-1 $\beta$  vyvolanou gliadinem u PBMC z krve celiaků, ale zároveň ukazují, že v tomto ději není zapojen kanál řízený vazbou ATP – P2X7.

A



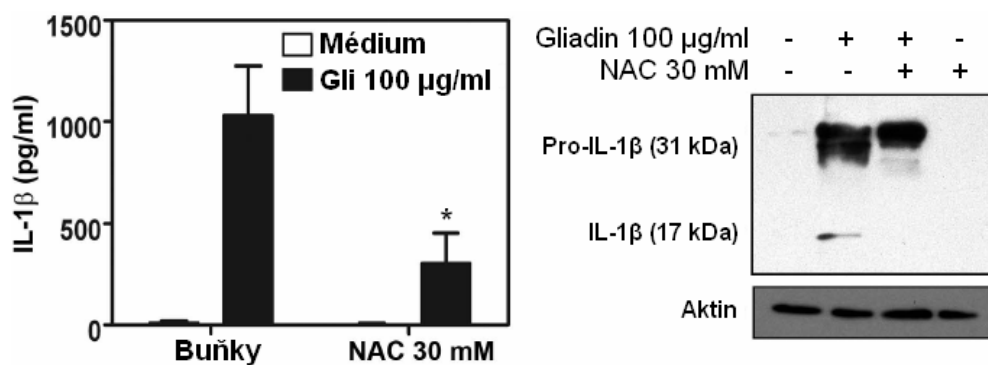
**B**

**Obr. 16: Maturace pro-IL-1 $\beta$  a sekrece IL-1 $\beta$  indukovaná gliadinem je závislá na uvolňování draselných iontů z buňky.** PBMC izolované z krve celiaků byly nejprve 1 hodinu stimulovány v médiu s 50 mM KCl nebo v médiu s inhibitory glybenclamidem (100 µM), quinidinem (100 µM) nebo KN-62 (10 µM) a následně byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100 µg/ml po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s 50 mM KCl a inhibitory bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM získané stimulací PBMC 10 pacientů s celiakií. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti buňkám stimulovaným štěpeným gliadinem v přítomnosti 50 mM KCl nebo jednotlivých inhibitorů je vyjádřena jako \*\*\*, kde \*\*\* odpovídá  $P < 0,001$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) V připravených buněčných lyzátech byla specifickou protilátkou detekována přítomnost obou forem IL-1 $\beta$ . Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů.

Abychom určili, zda gliadinem vyvolaná sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC pacientů s celiakií je závislá také na zvýšené hladině ROS v buňce, byly PBMC izolované z krve pacientů s celiakií před stimulací štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml) 1 hodinu preinkubovány s inhibitorem NAC (koncentrace 30 mM), který v buňce vychytává ROS. Jak je ukázáno na obr. 17, byla v buněčných supernatantech od PBMC stimulovaných štěpeným gliadinem v médiu s NAC stanovena ELISA testem (4.2.3) signifikantně nižší koncentrace IL-1 $\beta$  než v buněčných supernatantech od PBMC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem.

Tyto výsledky byly ověřeny také metodou Western blot (4.2.4) (obr. 17). V lyzátech z PBMC, které byly nejprve 1 hodinu prestimulovány s inhibitorem NAC (použitá koncentrace 30 mM) a následně 24 hodin stimulovány štěpeným

gliadinem (konc. 100  $\mu\text{g/ml}$ ), nebyla specifickou protilátkou detekována štěpená forma IL-1 $\beta$ . Navíc bylo u PBMC stimulovaných gliadinem v přítomnosti NAC detekováno menší množství pro-IL-1 $\beta$ , což je v souladu s pozorováními, že ROS mohou ovlivňovat signál způsobující expresi prekurzoru IL-1 $\beta$  (Asehnoune *et al.*, 2004). Tyto výsledky ukazují, že hladina ROS v PBMC celiaků ovlivňuje produkci IL-1 $\beta$  vyvolanou gliadinem.



**Obr. 17: Produkce IL-1 $\beta$  indukovaná gliadinem je závislá na hladině ROS v buňce.** PBMC izolované z krve celiaků byly nejprve 1 hodinu stimulovány v médiu s inhibitorem NAC (30 mM) a následně byly stimulovány štěpeným gliadinem v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s inhibitorem NAC bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM získané stimulací PBMC 10 pacientů s celiakií. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti buňkám stimulovaným štěpeným gliadinem v přítomnosti NAC je vyjádřena jako \*, kde \* odpovídá  $P < 0,05$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) V připravených buněčných lysátech byla detekována přítomnost obou forem IL-1 $\beta$ . Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lysátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů.

### **5.5 Gliadinem indukovaná exprese pro-IL-1 $\beta$ u PBMC získaných z periferní krve pacientů je řízena signálními drahami, v nichž jsou zapojeny kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF- $\kappa$ B**

Je známo, že v expresi prozánětlivých cytokinů (včetně IL-1 $\beta$ ) se uplatňují kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF- $\kappa$ B (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006). Navíc v naší laboratoři bylo již dříve ukázáno, že v signálních drahách spouštěných gliadinem, jež v důsledku vedou k aktivaci monocytů, PBMC a DC, hraje roli právě transkripční faktor NF- $\kappa$ B a také některé kinázy rodiny MAPK (Cinová *et al.*, 2007;

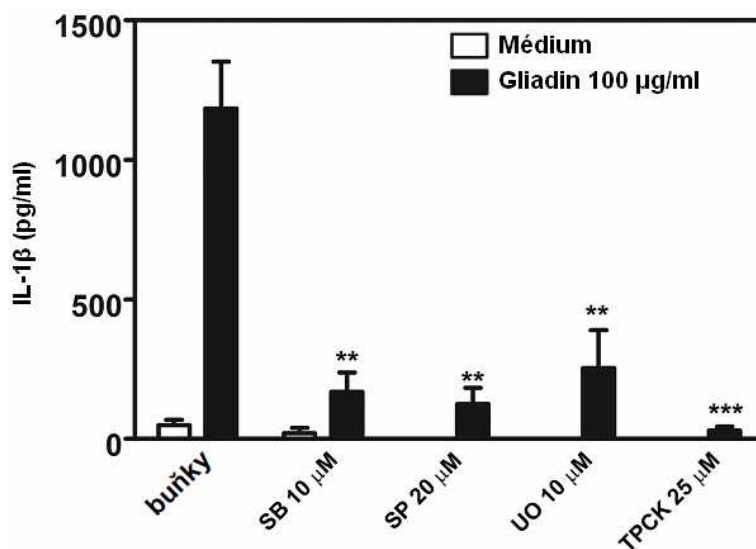
Chládková *et al.*, 2011; Jelínková *et al.*, 2004; Palová-Jelínková *et al.*, 2005). Proto bylo dále analyzováno, zda jsou NF- $\kappa$ B a kinázy rodiny MAPK zapojeny také v gliadinem řízené expresi pro-IL-1 $\beta$  u PBMC izolovaných z krve celiaků.

K tomuto účelu byly PBMC izolované z krve pacientů s celiakií před stimulací štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml) nejprve 1 hodinu preinkubovány s následujícími inhibitory: inhibitor NF- $\kappa$ B, TPCK (použitá koncentrace 25  $\mu$ M), který stabilizuje I- $\kappa$ B- $\alpha$  (buněčný inhibitor NF- $\kappa$ B) proti degradaci; dále inhibitor kinázy p38, SB203580 (použitá koncentrace 10  $\mu$ M); inhibitor kinázy JNK, SP600125 (použitá koncentrace 20  $\mu$ M); a inhibitor kinázy ERK, UO126 (použitá koncentrace 10  $\mu$ M). Následně bylo v buněčných supernatantech stanoveno množství sekretovaného IL-1 $\beta$ , k tomuto účelu byl použit ELISA test (4.2.3). Jak je ukázáno na obr. 18 A, inhibice transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a stejně tak každé z testovaných kináz rodiny MAPK vedla k signifikantnímu poklesu množství sekretovaného IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných štěpeným gliadinem oproti buňkám stimulovým pouze štěpeným gliadinem.

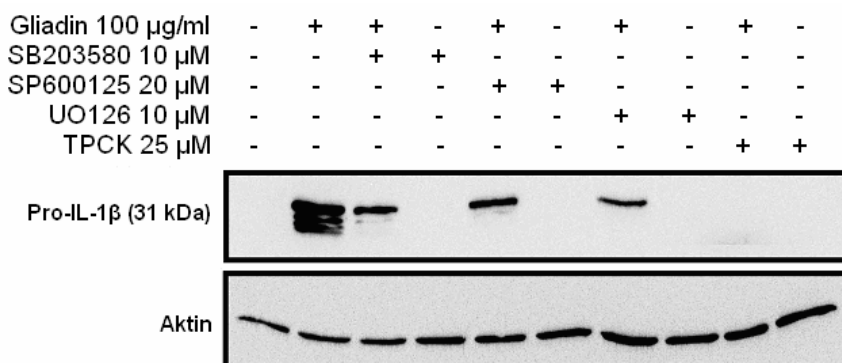
Zda dochází skutečně k ovlivnění exprese pro-IL-1 $\beta$  bylo stanoveno metodou Western blot (4.2.4). I v tomto případě byly PBMC izolované z krve pacientů s celiakií před stimulací štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml) nejprve 1 hodinu preinkubovány s inhibitory TPCK (použitá koncentrace 25  $\mu$ M), SB203580 (použitá koncentrace 10  $\mu$ M), SP600125 (použitá koncentrace 20  $\mu$ M) a UO126 (použitá koncentrace 10  $\mu$ M). Následně byl v připravených lyzátech specifickou protilátkou detekován pro-IL-1 $\beta$ . Jak je ukázáno na obr. 18 B, inhibice transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a stejně tak každé z testovaných kináz rodiny MAPK vedla k výraznému poklesu exprese pro-IL-1 $\beta$ .

Celkově tyto výsledky ukazují, že v expresi pro-IL-1 $\beta$ , kterou u PBMC z krve celiaků vyvolává gliadin, se uplatňuje jak transkripční faktor NF- $\kappa$ B, tak jednotliví členové rodiny MAPK – kinázy p38, ERK i JNK.

A



B

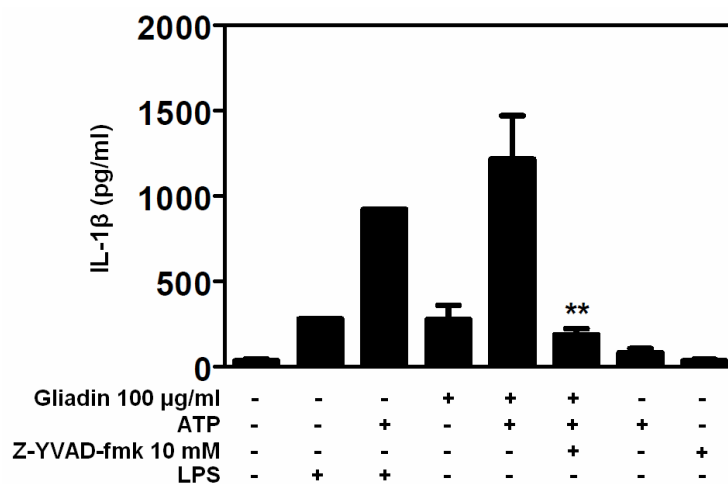


**Obr. 18: V dráze řídicí expresi pro-IL-1β vyvolanou účinkem gliadinu jsou zapojeny kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF-κB.** PBMC izolované z krve celiaků byly nejprve 1 hodinu stimulovány v médiu s inhibitory SB203580 (10 µM), SP600125 (20 µM), UO126 (10 µM) a TPCK (25 µM) a následně byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100 µg/ml po 24 hodin. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s inhibitory bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1β pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM získané stimulací PBMC 10 pacientů s celiakií. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem oproti buňkám stimulovaným štěpeným gliadinem v přítomnosti jednotlivých inhibitorů je vyjádřena jako \*\* nebo \*\*\*, kde \*\* odpovídá  $P < 0,01$  a \*\*\* odpovídá  $P < 0,001$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) V připravených buněčných lyzátech byla specifickou protilátkou detekována přítomnost pro-IL-1β. Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů.

## **5.6 Pro sekreci IL-1 $\beta$ u myších BMDC stimulovaných gliadinem je vyžadována kaspáza-1 a proteiny NLRP3 a ASC**

Předchozí výsledky ukazují, že gliadin u PBMC izolovaných z periferní krve pacientů s celiakií vyvolává expresi, maturaci a sekreci IL-1 $\beta$ , přičemž maturace a sekrece vyžaduje kaspázu-1. Další část studie rozšiřující tyto poznatky byla vypracována na myších buňkách, protože u tohoto modelu bylo možné využít výhody, kterou představují myší kmeny postrádající vybrané funkční proteiny.

Nejprve bylo ověřeno, zda i v tomto modelu vyvolává stimulace buněk gliadinem sekreci IL-1 $\beta$  a zda je maturace a sekrece IL-1 $\beta$  závislá na kaspáze-1. Z prekursorů z kostní dřeně myši kmene C57BL/10 byly připraveny dendritické buňky (BMDC) (4.2.2.3). DC a makrofágy pro sekreci IL-1 $\beta$  vyžadují kromě signálu pro expresi pro-IL-1 $\beta$  ještě druhý signál aktivující inflamazóm. Proto byly BMDC kromě 24 hodinové stimulace štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml), stimulovány také 21,5 hodiny štěpeným gliadinem a následně 2,5 hodiny ATP (použitá koncentrace 2 mM). Pro potvrzení úlohy kaspázy-1 byly BMDC před stimulací štěpeným gliadinem také 1 hodinu inkubovány se specifickým inhibitorem kaspázy-1, Z-YVAD-fmk (použitá koncentrace 10  $\mu$ M). Jako kontrola byly použity BMDC stimulované 24 hodin LPS (100 ng/ml) a BMDC stimulované 21,5 hodiny LPS s přídatkem ATP (2 mM) na 2,5 hodiny. Poté byla v buněčných supernatantech ELISA testem (4.2.3) stanovena koncentrace IL-1 $\beta$ . Jak je patrné z obr. 19, bez přidání ATP gliadin vyvolává u myších BMDC pouze mírnou sekreci IL-1 $\beta$ , naopak vysoká koncentrace IL-1 $\beta$  byla stanovena v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných štěpeným gliadinem spolu s ATP (stejně výsledky byly naměřeny také u kontrol – BMDC stimulovaných LPS a LPS spolu s ATP). Tato data potvrzují skutečnost, že BMDC pro sekreci IL-1 $\beta$  vyžadují 2. signál, který jim stimulace pouze gliadinem nezajišťuje v dostatečné míře. Preinkubace s inhibitorem Z-YVAD-fmk způsobila velmi výrazné snížení sekrece IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem spolu s ATP. Z těchto výsledků lze usoudit, že gliadin u myších BMDC indukuje sekreci IL-1 $\beta$  a tento děj je závislý na kaspáze-1.



**Obr. 19: Pro sekreci IL-1 $\beta$  u myších BMDC stimulovaných gliadinem je vyžadována kaspáza-1.** Myší BMDC byly stimulovány pouze štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml po 24 hodin nebo štěpeným gliadinem 21,5 hodiny a následně 2,5 hodiny 2 mM ATP, některé vzorky byly preinkubovány s inhibítozem kaspázy-1, Z-YVAD-fmk, o koncentraci 10  $\mu$ M. Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované pouze v médiu s inhibítozem Z-YVAD-fmk nebo s ATP bez stimulace gliadinem. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky stimulované LPS (100 ng/ml) po 24 hodin a buňky stimulované LPS 21,5 hodiny s ATP (2 mM) přidaným na poslední 2,5 hodiny. V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené koncentrace IL-1 $\beta$  jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM ze 4 nezávislých experimentů. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem s ATP oproti hodnotám naměřeným u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem s ATP v přítomnosti Z-YVAD-fmk je vyjádřena jako \*\*, kde \*\* odpovídá  $P < 0,01$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).

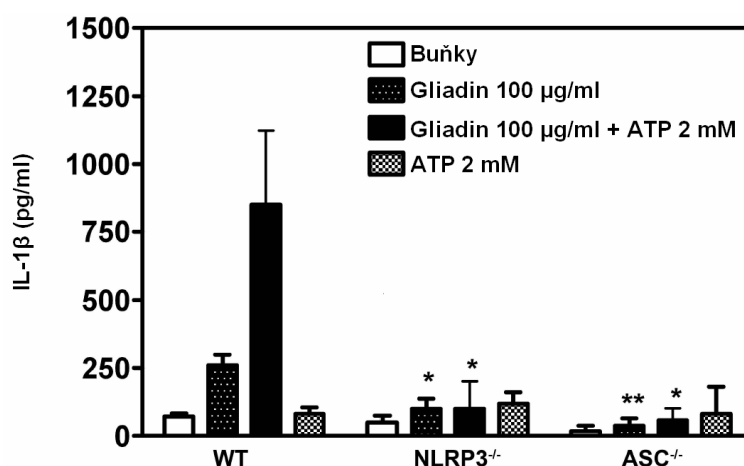
K autokatalytické aktivaci kaspázy-1 je vyžadováno, aby byla vázána do proteinového komplexu, inflamazómu. Existují studie, které potvrzují roli inflamazómu NLRP3 v patogenezi některých autoimunitních a autoinflamatorních onemocnění a nedávno se objevily také první náznaky jeho možné účasti v patogenezi celiakie (Pontillo *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2011). Také naše výše uvedené výsledky (maturace a sekrece IL-1 $\beta$  indukovaná gliadinem u PBMC celiaků závisí na uvolňování draselných iontů a produkci ROS) a také skutečnost, že inhibitor glybenclamide, který funguje jako inhibitor draselných kanálů řízených vazbou ATP a aktivace inflamazómu NLRP3, snižoval sekreci IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem, roli inflamazómu NLRP3 podporují. Proto jsme se rozhodli ověřit účast inflamazómu NLRP3 v gliadinem indukované maturaci a sekreci IL-1 $\beta$ .

K tomuto účelu byly využity buňky myšího kmene C57BL/6, které postrádaly funkční proteiny z komplexu inflamazómu NLRP3, konkrétně protein NLRP3 nebo ASC.

Jako kontrola byly použity buňky myšního kmene C57BL/6 s divokými formami (WT, z angl. wild type) příslušných genů.

BMDC byly stimulovány 24 hodin štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo nejprve 21,5 hodiny štěpeným gliadinem a následně 2,5 hodiny ATP (použitá koncentrace 2 mM). Poté byla v buněčných supernatantech ELISA testem (4.2.3) stanovena koncentrace IL-1 $\beta$ .

Jak je ukázáno na obr. 20, u BMDC postrádajících funkční protein NLRP3 nebo ASC byla naměřená koncentrace IL-1 $\beta$  výrazně nižší, a to jak v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem, tak v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných štěpeným gliadinem spolu s ATP, oproti hodnotám naměřeným v supernatantech WT buněk. Tyto výsledky ukazují, že pro sekreci IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem, jsou nutné proteiny NLRP3 a ASC.



**Obr. 20:** Pro sekreci IL-1 $\beta$  u myších BMDC stimulovaných gliadinem jsou nutné proteiny NLRP3 a ASC. BMDC (izolované z myšního kmene C57BL/6 buď s divokými formami příslušných genů (WT), nebo postrádající funkční protein NLRP3 (NLRP3<sup>-/-</sup>) či protein ASC (ASC<sup>-/-</sup>)) byly stimulovány pouze štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  po 24 hodin nebo štěpeným gliadinem 21,5 hodiny a následně 2,5 hodiny 2 mM ATP. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s ATP bez stimulace gliadinem. V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené koncentrace IL-1 $\beta$  jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM ze 3 nezávislých experimentů. Míra signifikance rozdílů hodnot naměřených u WT buněk stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP oproti hodnotám naměřeným u buněk NLRP3<sup>-/-</sup> a ASC<sup>-/-</sup> stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP je vyjádřena jako \* nebo \*\*, kde \* odpovídá  $P < 0,05$  a \*\* odpovídá  $P < 0,01$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).



## **5.7 V dráze řídicí expresi pro-IL-1 $\beta$ u myších BMDC stimulovaných gliadinem se uplatňuje signalizace receptory TLR, jež zahrnuje proteiny MyD88 a TRIF**

Je známo, že v expresi prozánětlivých cytokinů (včetně IL-1 $\beta$ ) se uplatňuje signalizace receptory TLR (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006). Navíc se v předchozí části naší práce potvrdilo, že v expresi pro-IL-1 $\beta$  po stimulaci PBMC celiaků hrají roli kinázy rodiny MAPK a transkripční faktor NF- $\kappa$ B, tedy proteiny, které jsou součástí signálních drah řízených právě receptory TLR. Rozhodli jsme se proto zaměřit na úlohu dalších proteinů, které se uplatňují v signalizaci receptory TLR. Mezi tyto proteiny patří adaptorové proteiny Myd88 a TRIF (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006).

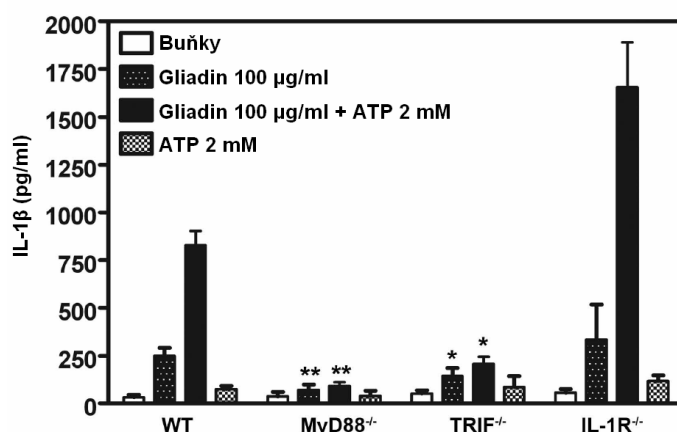
K tomuto účelu byly využity buňky myšího kmene C57BL/6, které postrádaly funkční proteiny MyD88, TRIF či IL-1R. Buňky postrádající funkční protein IL-1R byly zařazeny z důvodu, že protein MyD88 slouží jako adaptorová molekula, kromě signalizace receptory TLR, také v signalizaci receptorem IL-1R (O'Neill, 2008). Jako kontrola byly použity WT buňky myši kmene C57BL/6.

BMDC byly stimulovány 24 hodin štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml) nebo nejprve 21,5 hodiny štěpeným gliadinem a následně 2,5 hodiny ATP (použitá koncentrace 2 mM). Poté byla v buněčných supernatantech ELISA testem (4.2.3) stanovena koncentrace IL-1 $\beta$ . Jak je patrné z obr. 21 A, u BMDC postrádajících funkční protein MyD88 nebo TRIF byla naměřená koncentrace IL-1 $\beta$  výrazně nižší, a to jak v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem, tak v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných štěpeným gliadinem spolu s ATP, oproti hodnotám naměřeným v supernatantech WT buněk. Naopak snížení koncentrace IL-1 $\beta$  nebylo pozorováno v buněčných supernatantech BMDC postrádajících funkční protein IL-1R.

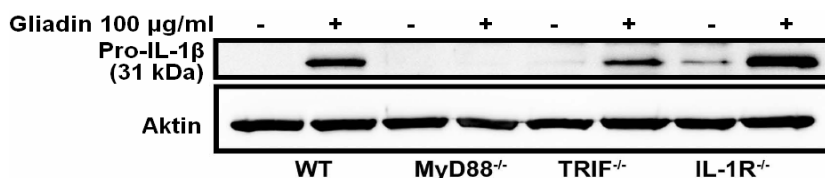
Zda skutečně dochází k ovlivnění přímo exprese pro-IL-1 $\beta$ , bylo stanoveno metodou Western blot (4.2.4). BMDC byly stimulovány 24 hodin štěpeným gliadinem (konc. 100  $\mu$ g/ml). Následně byl v připravených lyzátech specifickou protilátkou detekován pro-IL-1 $\beta$ . Protože v lyzátech připravených z BMDC postrádajících funkční protein MyD88 nebyl detekován žádný pro-IL-1 $\beta$ , lze usoudit, že protein MyD88 se významně podílí na expresi pro-IL-1 $\beta$ . V lyzátech připravených z BMDC, jež postrádaly funkční protein TRIF, bylo detekováno snížené množství pro-IL-1 $\beta$  oproti množství pro-IL-1 $\beta$  detekovaného u lyzáto z WT buněk, což naznačuje, že i protein TRIF hraje

v expresi pro-IL-1 $\beta$  určitou roli. Naopak u lyzátů připravených z BMDC postrádajících funkční protein IL-1R bylo detekováno nesnížené množství pro-IL-1 $\beta$ , to naznačuje, že protein IL-1R nehraje v expresi pro-IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem významnou roli. Výsledky jsou shrnuty na obr. 21. Výsledky získané oběma metodami naznačují, že v expresi pro-IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem, se může uplatňovat signalizace receptory TLR, jež zahrnuje proteiny MyD88 a TRIF.

A



B



**Obr. 21: Pro expresi pro-IL-1 $\beta$  u myších BMDC stimulovaných gliadinem jsou nutné proteiny MyD88 a TRIF.** BMDC (izolované z myšího kmene C57BL/6 buď s divokými formami příslušných genů (WT), nebo postrádající funkční protein Myd88 (Myd88<sup>-/-</sup>) nebo protein TRIF (TRIF<sup>-/-</sup>) či protein IL-1R (IL-1R<sup>-/-</sup>)) byly stimulovány pouze štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml po 24 hodin nebo štěpeným gliadinem 21,5 hodiny a následně 2,5 hodiny 2 mM ATP. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s ATP bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené koncentrace IL-1 $\beta$  jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM ze 3 nezávislých experimentů. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u WT buněk stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP oproti hodnotám naměřeným u buněk Myd88<sup>-/-</sup> a TRIF<sup>-/-</sup> stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP je vyjádřena jako \* nebo \*\*, kde \* odpovídá P < 0,05 a \*\* odpovídá P < 0,01 (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) V připravených buněčných lyzátech byla specifickou protilátkou detekována přítomnost pro-IL-1 $\beta$ . Detekce aktinu byla použita jako kontrola. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů.

V poslední části jsme se zaměřili na roli konkrétních receptorů TLR – TLR2 a TLR4, které byly již dříve v souvislosti s celiakií zkoumány (Junker *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2006).

K tomuto účelu byly využity buňky myšního kmene C57BL/10, které postrádaly funkční proteiny TLR2, TLR4 nebo TLR2 i TLR4 zároveň. Jako kontrola byly použity WT buňky myši kmene C57BL/10.

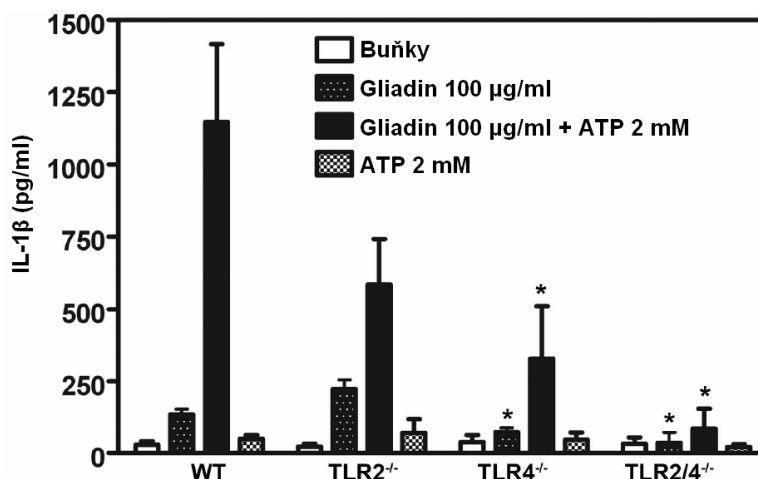
BMDC byly stimulovány 24 hodin štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml) nebo nejprve 21,5 hodiny štěpeným gliadinem a následně 2,5 hodiny ATP (použitá koncentrace 2 mM). Poté byla v buněčných supernatantech ELISA testem (4.2.3) stanovena koncentrace IL-1β. Jak je patrné z obr. 22 A, u BMDC postrádajících funkční protein TLR2 byla naměřená koncentrace IL-1β mírně nižší (rozdíl nebyl signifikantní), ale jen v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných štěpeným gliadinem spolu s ATP, oproti hodnotám naměřeným v supernatantech WT buněk, nikoli v buněčných supernatantech BMDC stimulovaných pouze štěpeným gliadinem. U BMDC postrádajících funkční protein TLR4 byla naměřená koncentrace IL-1β výrazně nižší, a to jak v supernatantech buněk stimulovaných pouze štěpeným gliadinem, tak v supernatantech buněk stimulovaných štěpeným gliadinem spolu s ATP, oproti hodnotám naměřeným v supernatantech WT buněk. Zcela minimální koncentrace IL-1β byla naměřena v buněčných supernatantech BMDC postrádajících oba funkční proteiny (TLR2 i TLR4).

Zda skutečně dochází k ovlivnění přímo exprese pro-IL-1β, bylo stanoveno metodou Western blot (4.2.4). BMDC byly stimulovány 24 hodin štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml). Následně byl v připravených lyzátech specifickou protilátkou detekován pro-IL-1β. Jak ukazuje obr. 22 B, v lyzátech připravených z BMDC postrádajících funkční proteiny TLR2 i TLR4 nebyl detekován žádný pro-IL-1β. V lyzátech připravených z BMDC, jež postrádaly funkční protein TLR4, bylo detekováno výrazně snížené množství pro-IL-1β oproti množství pro-IL-1β detekovaného u lyzátů z WT buněk. Naopak u lyzátů připravených z BMDC postrádajících funkční protein TLR2 bylo detekováno nezměněné množství pro-IL-1β v porovnání s množstvím pro-IL-1β detekovaným u lyzátů z WT buněk.

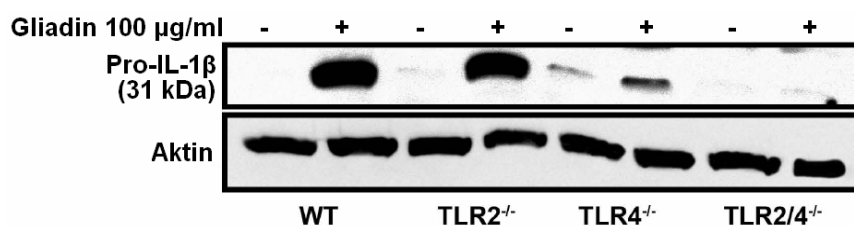
Tyto výsledky podporují předpoklad, že receptor TLR4 hraje roli v gliadinem indukované expresi a sekreci IL-1β. U buněk, které postrádaly funkční protein TLR2, sice nedošlo k ovlivnění exprese pro-IL-1β po stimulaci gliadinem, přesto protein TLR2 pravděpodobně nějakou roli v expresi pro-IL-1β hraje. To naznačují výsledky získané ze

stimulace buněk postrádajících oba funkční proteiny TLR2 i TLR4, kde je exprese pro-IL-1 $\beta$  zcela potlačena, na rozdíl od WT buněk a buněk bez funkčního proteinu TLR4, kde je sice exprese pro-IL-1 $\beta$  snížena, nikoli však zcela.

A



B

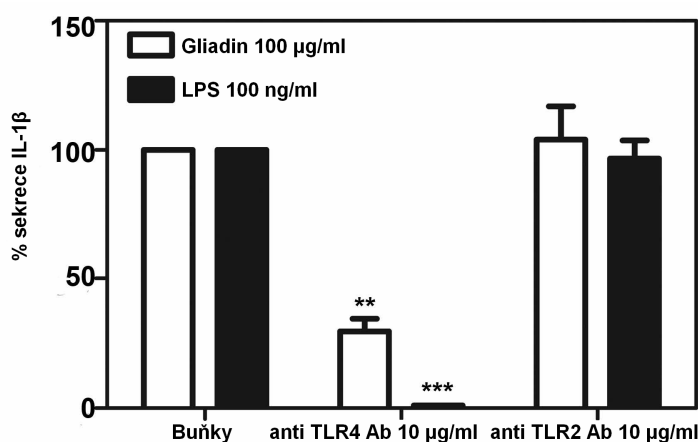


**Obr. 22: V dráze řídicí expresi pro-IL-1 $\beta$  u myších BMDC stimulovaných gliadinem se uplatňuje signalizace receptory TLR.** BMDC (izolované z myšského kmene C57BL/6 buď s divokými formami příslušných genů (WT), nebo postrádající funkční protein TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) nebo protein TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) či oba proteiny TLR2 i TLR4 (TLR2/4<sup>-/-</sup>)) byly stimulovány pouze štěpeným gliadinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml po 24 hodin nebo štěpeným gliadinem 21,5 hodiny a následně 2,5 hodiny 2 mM ATP. Jako kontrola byly použity buňky inkubované pouze v médiu a buňky inkubované v médiu s ATP bez stimulace gliadinem. (A) V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1 $\beta$  pomocí ELISA testu. Naměřené koncentrace IL-1 $\beta$  jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace + hodnota SEM ze 3 nezávislých experimentů. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u WT buněk stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP oproti hodnotám naměřeným u buněk TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> a TLR2/4<sup>-/-</sup> stimulovaných štěpeným gliadinem nebo štěpeným gliadinem s ATP je vyjádřena jako \*, kde \* odpovídá  $P < 0,05$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test). (B) V připravených buněčných lyzátech byla specifickou protilátkou detekována přítomnost pro-IL-1 $\beta$ . Detekce aktinu byla použita pro kontrolu nanesení buněčného lyzátu na gel pro SDS-PAGE. Jedná se o reprezentativní obrázek ze 3 nezávislých experimentů.

Výsledky podporující roli signalizace receptory TLR4 a TLR2 u buněk stimulovaných gliadinem získané stimulací myších BMDC byly ověřeny na PBMC izolovaných z krve pacientů s celiakií, a to použitím protilátek, které blokují signalizaci receptory TLR2 a TLR4.

PBMC získané z periferní krve celiaků byly proto nejprve inkubovány s neutralizačními protilátkami proti TLR2 nebo TLR4 (o koncentraci 10 µg/ml) po dobu 1 hodiny a následně byly 24 hodin stimulovány štěpeným gliadinem (konc. 100 µg/ml). V buněčných supernatantech byla ELISA testem (4.2.3) stanovena koncentrace IL-1β. Jak je ukázáno na obr. 23, preinkubace PBMC s neutralizační protilátkou proti TLR2 neměla na sekreci IL-1β u buněk stimulovaných gliadinem vliv, naopak preinkubace PBMC s neutralizační protilátkou proti TLR4 inhibovala sekreci IL-1β u buněk stimulovaných gliadinem, a to o 70 % oproti PBMC stimulovaným pouze štěpeným gliadinem. Podobné výsledky byly zjištěny také u buněk stimulovaných LPS (konc. 100 ng/ml).

Tyto výsledky potvrzují roli receptoru TLR4 v signálních drahách řídících expresi pro-IL-1β u PBMC stimulovaných gliadinem.



**Obr. 23:** V dráze řídící expresi pro-IL-1β u PBMC z krve celiaků stimulovaných gliadinem se uplatňuje signalizace receptory TLR. PBMC izolované z krve celiaků byly stimulovány štěpeným gliadinem o koncentraci 100 µg/ml po 24 hodin, některé vzorky byly preinkubovány s neutralizační protilátkou proti TLR2 nebo TLR4 o koncentraci 10 µg/ml. Jako kontrola byly použity buňky inkubované v médiu s LPS (použitá koncentrace 100 ng/ml). V buněčných supernatantech byla stanovena koncentrace IL-1β pomocí ELISA testu. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny jako průměrné hodnoty koncentrace IL-1β v % + hodnota SEM v % získané ze stimulací buněk 4 pacientů s celiakií. Míra signifikance rozdílu hodnot naměřených u buněk stimulovaných štěpeným gliadinem či LPS oproti buňkám stimulovaným štěpeným gliadinem či LPS v přítomnosti neutralizačních protilátek je vyjádřena jako \*\* nebo \*\*\*, kde \*\* odpovídá  $P < 0,01$  a \*\*\* odpovídá  $P < 0,001$  (neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney test).

## 6 Diskuze

IL-1 $\beta$  je významný prozánětlivý cytokin, který je produkován buňkami imunitního systému při infekci organismu, ale také při zánětlivých a autoimunitních onemocněních. U střevních autoimunitních onemocnění je IL-1 $\beta$  důležitým mediátorem střevního zánětu účastníci se jak jeho iniciace, tak amplifikace. Zvýšená hladina IL-1 $\beta$  byla stanovena v sérech pacientů s nespecifickými střevními záněty i s celiakií. Stanovená koncentrace IL-1 $\beta$  v sérech pacientů navíc korelovala s mírou zánětu (Fornari *et al.*, 1998; Ligumsky *et al.*, 1990).

Nedávná studie ukázala, že u buněk, které byly izolovány z periferní krve pacientů s celiakií a následně byly stimulovány štěpeným gliadinem dochází ve větší míře k sekreci IL-1 $\beta$  v porovnání se stejně připravenými a stimulovanými buňkami od zdravých dárců (Harris *et al.*, 2008). Tyto výsledky byly nejprve v rámci této práce potvrzeny a navíc rozšířeny o stanovení sekrece dalšího významného člena rodiny IL-1 – IL-1 $\alpha$ . IL-1 $\alpha$  je více než IL-1 $\beta$  produkován celou řadou imunitních i neimunitních buněk, a dokonce také T buňkami (Zubiaga *et al.*, 1991; Zúñiga-Pflücker *et al.*, 1995), což by mohlo vysvětlovat vyšší koncentraci IL-1 $\alpha$  stanovenou v kultivačním médiu PBMC než v kultivačním médiu monocytů stimulovaných gliadinem (obr. 11 B). Také funkce tohoto cytokinu jsou zčásti odlišné od IL-1 $\beta$  (např. jeho prekurzor je již aktivní a nemusí být štěpen a funguje jako regulátor transkripce genů). Do budoucna by bylo jistě zajímavé zjistit, jakými mechanismy IL-1 $\alpha$  přispívá k patogenezi celiakie.

V naší práci byla zvýšená sekrece IL-1 $\beta$  pozorována u buněk zdravých dárců po stimulaci gliadinem. U PBMC a monocytů izolovaných z krve celiaků však byla sekrece přibližně 2–3 vyšší (obr. 11 A). V porovnání s rozdílnou mírou sekrece IL-1 $\alpha$  u populací monocytů a PBMC byla sekrece IL-1 $\beta$  u monocytů srovnatelná se sekrecí stanovenou u PBMC. Tato data potvrzují výsledky Harris a spol. (2008), že hlavním zdrojem IL-1 $\beta$  u celiakie jsou monocyty.

Vzhledem k tomu, že IL-1 $\beta$  se v buňkách neprodukuje konstitutivně, dalo se předpokládat, že sekrece IL-1 $\beta$  po stimulaci PBMC gliadinem je spojená s vyšší expresí pro-IL-1 $\beta$  a následnou maturací pro-IL-1 $\beta$ . Nejprve byl tedy tento předpoklad ověřen. Získané výsledky potvrdily, že gliadin u PBMC izolovaných z krve pacientů s celiakií výrazně indukoval expresi pro-IL-1 $\beta$ , jež byla spojená s následnou maturací pro-IL-1 $\beta$  a sekrecí IL-1 $\beta$  (obr. 12).

V rámci této práce jsme se tedy dále zaměřili na to, které mechanismy se v dějích exprese, maturace a sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem uplatňují.

Nejprve byla zkoumána účast kaspázy-1 v maturaci pro-IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem. Použitím specifického inhibitoru Z-YVAD-fmk bylo prokázáno, že maturace pro-IL-1 $\beta$ , jehož exprese je vyvolána gliadinem, je zprostředkována kaspázou-1 (obr. 13).

V nedávné době byly publikovány výsledky studií, dle kterých se zdá, že kaspáza-1 se v krevních monocitech nachází již v aktivní formě (Netea *et al.*, 2009). Tyto výsledky byly v rámci naší práce potvrzeny (obr. 14). Dále jsme proto chtěli ověřit, zda gliadin vyvolává ještě další aktivaci kaspázy-1 nad tuto bazální hladinu. Jak metoda Western blot (obr. 14), tak analýza buněk na průtokovém cytometru s využitím fluorescenčně značeného inhibitoru kaspázy-1 (obr. 15) prokázaly schopnost gliadinu aktivovat kaspázu-1 u PBMC z krve pacientů s celiakií. Ačkoli metodou Western blot nebylo detekováno zvýšení aktivity kaspázy-1 u PBMC zdravých dárců, analýza na průtokovém cytometru ukázala, že i u PBMC zdravých dárců gliadin jistě další aktivaci kaspázy-1 indukuje. Je pravděpodobné, že zvýšení aktivity kaspázy-1 gliadinem u PBMC zdravých dárců, které se podle analýzy průtokovou cytometrií pohybovalo přibližně okolo 30 % (u pacientů v průměru okolo 220 %) oproti nestimulovaným buňkám, nebylo pro detekci metodou Western blot dostatečné a tato metoda není pro detekci takto nízké aktivity dostatečně citlivá.

Dále jsme se zaměřili na děje ovlivňující aktivitu kaspázy-1. Vycházeli jsme z práce Netea a spol. (2009), ve které bylo pozorováno mírné zvýšení aktivity kaspázy-1 nad bazální hladinu po působení LPS na krevní monocyty. Dle jejich předpokladu je sekrece IL-1 $\beta$  z monocytů bez nutnosti obdržení exogenního 2. signálu umožněna kromě konstitutivní aktivity kaspázy-1 navíc také uvolňováním endogenního ATP. Toto ATP se následně váže na kanál P2X7 na cytoplazmatické membráně buněk. Navázání ATP na kanál P2X7 vyvolá jeho otevření, což vede k poklesu koncentrace draselných iontů v buňce, a to je pro aktivaci kaspázy-1 nezbytné. Jejich předpoklad vychází z pozorování, že LPS indukoval po 4 hodinové stimulaci monocytů uvolňování endogenního ATP a sekreci IL-1 $\beta$  bylo možné inhibovat oxidovaným ATP – inhibitorem draselného kanálu P2X7.

Protože i my jsme po působení gliadinu na PBMC pozorovali zvýšenou aktivitu kaspázy-1, zaměřili jsme se na vliv koncentrace draselných iontů v buňce a roli kanálu P2X7 v tomto procesu. Výsledky naší studie ukazují, že maturace a sekrece IL-1 $\beta$

u PBMC pacientů stimulovaných gliadinem je závislá na uvolňování draselných iontů z buňky. Pokud byly buňky inkubovány a stimulovány gliadinem v médiu, které obsahovalo 50 mM koncentraci draselných iontů, byla maturace a sekrece IL-1 $\beta$  výrazně snížena. Snížení maturace a sekrece IL-1 $\beta$  způsobilo i použití inhibitorů, které blokují uvolňování draselných iontů z buňky (obr. 16). Avšak použití inhibitoru draselného kanálu P2X7, jež je řízen vazbou ATP, maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  po stimulaci PBMC gliadinem nesnížilo (obr. 16). Zdá se tedy, že gliadinem indukovaná maturace a sekrece IL-1 $\beta$  z PBMC sice vyžaduje pokles koncentrace draselných iontů v buňce, ale nemusí se tak dít prostřednictvím P2X7 kanálu a ATP. Na rozdíl od studie Netea a spol. (2009) byly PBMC stimulovány gliadinem 24 hodin. Je tedy možné, že sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem či LPS je závislá na uvolňování endogenního ATP a jeho vazbě na kanál P2X7 pouze při krátkodobé stimulaci.

Provedli jsme proto měření sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC tří pacientů s celiakií po 3 a 24 hodinové stimulaci gliadinem a LPS (data neukázána). Po 3 hodinové stimulaci samotným gliadinem byla detekována zcela minimální či žádná sekrece IL-1 $\beta$ . Pokud bylo na závěrečných 30 minut stimulace přidáno ATP, bylo detekováno výrazně zvýšené množství IL-1 $\beta$  v buněčných supernatantech. Použití inhibitoru KN-62 zcela potlačilo zvýšenou sekreci IL-1 $\beta$  vyvolanou přidáním ATP. Po 24 hodinové stimulaci samotným gliadinem byla sekrece IL-1 $\beta$  detekována, ale přidání ATP na závěrečných 30 minut stimulace nezpůsobilo další výrazné zvýšení sekrece IL-1 $\beta$ . Obdobné výsledky byly získány i stimulací buněk LPS. Tato data tedy naznačují, že ačkoli maturace a sekrece IL-1 $\beta$  z PBMC celiaků stimulovaných 24 hodin nejsou závislé na ATP a P2X7, v případě krátkodobé stimulace by tomu tak mohlo být.

Tato data jsou shodná s pozorováními jiné skupiny. Dle jejich výsledků je sekrece IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných LPS a dalšími ligandy TLR receptorů závislá na ATP a jeho vazbě na kanál P2X7 pouze při krátkodobé (3 hod) stimulaci. Použití inhibitoru KN-62 u dlouhodobé stimulace buněk nesnížilo sekreci IL-1 $\beta$  (Ward *et al.*, 2010).

Jiné studie provedené na krevních monocytech ukazují, že v aktivaci inflamazómu a maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  hraje roli především redoxní stav uvnitř buňky (Hewinson *et al.* 2008; Tassi *et al.*, 2009). Výsledky jedné z těchto studií ukazují, že stimulace ligandy receptorů TLR vyvolává vyšší produkci ROS v monocytech, což je nezbytné pro maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  (Tassi *et al.*, 2009). U pacientů s celiakií byla potvrzena zvýšená produkce ROS po stimulaci gliadinem ve střevních epiteliálních buňkách a MDCC (Bergamo *et al.*, 2008, Luciani *et al.*, 2010). Výsledky našich pokusů prokazují roli ROS v sekreci IL-1 $\beta$



u monocytů stimulovaných gliadinem. Použití NAC (inhibitor ROS) způsobilo výrazné snížení detekovaného množství IL-1 $\beta$  v kultivačním médiu PBMC vyizolovaných z krve celiaků a stimulovaných gliadinem (obr. 17). Navíc byla u PBMC stimulovaných gliadinem v přítomnosti NAC detekována i nižší exprese pro-IL-1 $\beta$  (obr. 17). Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováními, že ROS neovlivňují pouze aktivitu inflamazómu, ale také aktivují transkripci genů řízených NF- $\kappa$ B, včetně genu pro IL-1 $\beta$  (Asehnoune *et al.*, 2004).

Celkově tedy tato data podporují skutečnost, že kaspáza-1 se u PBMC pacientů s celiakií i zdravých dárců nachází v aktivované formě a při stimulaci PBMC gliadinovými peptidy je možná její další aktivace. Zvýšená koncentrace sekretovaného IL-1 $\beta$  v kultivačním médiu PBMC izolovaných z krve celiaků oproti hodnotám stanoveným u PBMC od zdravých dárců se zdá být dána jednak zvýšenou expresí pro-IL-1 $\beta$ , a jednak vyšší aktivací kaspázy-1 po stimulaci gliadinem. Maturace a sekrece IL-1 $\beta$  je závislá na hladině draselných iontů a zvýšené produkci ROS v PBMC po stimulaci gliadinem. Je známo, že produkce ROS a snížená koncentrace draselných iontů v makrofázích a DC umožňují seskupování proteinů inflamazómu NLRP3, a tím aktivaci kaspázy-1. Jaký je ale přesný mechanismus jejich účinku u monocytů není známo. Stejně jako u makrofágů a DC jsou však tyto děje nezbytné pro maturaci a sekreci IL-1 $\beta$ . Bylo by proto zajímavé dále ověřit, jaký vliv má hladina draselných iontů a ROS v buňce přímo na aktivitu kaspázy-1, a případně zda tyto mechanismy ovlivňují aktivitu konstitutivně aktivní kaspázy-1 nebo/i aktivitu kaspázy-1 vyvolanou stimulací gliadinem.

V další části práce jsme ukázali, že také u myších BMDC je sekrece IL-1 $\beta$  vyvolaná stimulací gliadinem spolu s ATP závislá na aktivaci kaspázy-1 (obr. 19). Ze stanovené sekrece IL-1 $\beta$  vyvolané stimulací BMDC gliadinem, která je srovnatelná se sekrecí IL-1 $\beta$  vyvolanou LPS, a předběžně provedených pokusů se zdá, že stimulace gliadinem bez druhého signálu, např. ATP, nevyvolává u BMDC aktivaci kaspázy-1 nebo ne v dostatečné míře pro detekci použitými metodami. Jistě zajímavé by bylo srovnání účinků gliadinu na MDDC připravené z buněk zdravých dárců a pacientů s celiakií, které se v mechanismech aktivace kaspázy-1 podobají myším BMDC. Zda by například nedošlo k aktivaci kaspázy-1 u MDDC pacientů s celiakií stimulací pouze gliadinem bez nutnosti dodání exogenního druhého signálu.

Na myších BMDC postrádajících vybrané funkční proteiny bylo navíc zjištěno, že gliadinem vyvolaná sekrece IL-1 $\beta$  je závislá také na proteinu NLRP3 a ASC (obr. 20), tedy receptorovém a adaptorovém proteinu inflamazómu NLRP3. Celkově tedy tyto

výsledky potvrzují roli inflamazómu NLRP3 v sekreci IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem a spolu s daty získanými analýzou PBMC celiaků naznačují i případnou roli inflamazómu NLRP3 v gliadinem vyvolaném zánětlivém procesu u pacientů trpících celiakií.

Kromě signálních drah, které se uplatňují v maturaci pro-IL-1 $\beta$ , jsme se zaměřili také na signální dráhy, které řídí expresi pro-IL-1 $\beta$  u PBMC a BMDC stimulovaných gliadinem. U PBMC bylo použitím specifických inhibitorů ukázáno, že v drahách, jež řídí expresi pro-IL-1 $\beta$  po stimulaci gliadinem, se uplatňují kinázy z rodiny MAPK, konkrétně kinázy ERK, JNK a p38. Zcela klíčovou roli má také transkripční faktor NF- $\kappa$ B (obr. 18). Tyto výsledky odpovídají obecné představě aktivace genové exprese prozánětlivých cytokinů (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006), a navíc podporují dříve získané výsledky v naší laboratoři. Ty ukazují, že stimulace gliadinem způsobuje aktivaci signálních drah, jež v důsledku vedou k aktivaci monocytů, PBMC a DC. V těchto drahách jsou zapojeny transkripční faktor NF- $\kappa$ B a protein p38 (Cinová *et al.*, 2007; Chládková *et al.*, 2011; Jelínková *et al.*, 2004; Palová-Jelínková *et al.*, 2005).

Je známo, že v expresi pro-IL-1 $\beta$  se uplatňuje signalizace receptory TLR a NOD (Akira *et al.*, 2006; Creagh and O'Neill, 2006; Uematsu and Fujimoto, 2010). Přes jaký receptor ale působí gliadin není známo. Kromě transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a proteinu p38 však bylo ukázáno zapojení i dalších molekul v signálních drahách aktivovaných u imunitních buněk stimulovaných gliadinem. Mezi tyto molekuly patří adaptorový protein MyD88 (Thomas *et al.*, 2006). Naše výsledky získané stimulací BMDC postrádajících proteiny MyD88 či TRIF ukazují, že exprese a sekrece IL-1 $\beta$  u BMDC stimulovaných gliadinem je plně závislá na adaptorovém proteinu MyD88 a v menší míře také na adaptorovém proteinu TRIF (obr. 21).

Ačkoli jsou MyD88 a TRIF důležité adaptorové molekuly zajišťující signalizaci mezi povrchovými receptory TLR a transkripčním faktorem NF- $\kappa$ B, nebyla ve dvou studiích potvrzena role TLR2 ani TLR4 jako receptorů pro gliadin (Nikulina *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006). Jejich výsledky vylučují roli TLR4 v aktivaci BMDC a sekreci cytokinů účinkem gliadinu. Naopak ve studii Junker a spol. z roku 2009 autoři deklarují, že u BMDC, jež postrádají funkční receptor TLR4, nedochází po stimulaci gliadinem k sekreci prozánětlivých cytokinů na rozdíl od stanovené sekrece u WT buněk. Navíc inhibice receptoru TLR4 u MDCC pacientů s celiakií použitím neutralizační protilátky proti TLR4 má shodný inhibiční efekt na sekreci cytokinů, což podle autorů činí z TLR4 receptor pro gliadin u buněk přirozené imunity (Junker *et al.*, 2009).

Naše výsledky, získané ze stimulace myších BMDC postrádajících funkční receptor TLR2 nebo TLR4 nebo oba receptory současně, se shodují s tvrzením Junker a spol. (2009), tedy že receptor TLR4 hraje roli ve zprostředkování účinků gliadinu na BMDC. Koncentrace sekretovaného IL-1 $\beta$  po stimulaci gliadinem u BMDC postrádajících funkční TLR4 byla výrazně snížena oproti hodnotám naměřeným u WT buněk. Také bylo detekováno výrazně snížené množství pro-IL-1 $\beta$  v buněčných lyzátech připravených z BMDC TLR4<sup>-/-</sup> stimulovaných gliadinem oproti lyzátem připraveným z WT BMDC (obr. 22). Také v případě BMDC postrádajících funkční TLR2 byla sekrece IL-1 $\beta$  mírně snížena oproti hodnotám naměřeným u WT buněk (obr. 22). Ačkoli bylo u lyzátem připravených z BMDC TLR2<sup>-/-</sup> stimulovaných gliadinem detekováno množství pro-IL-1 $\beta$  srovnatelné s množstvím stanoveným u lyzátem připravených z WT BMDC, zdá se, že receptor TLR2 má určitý vliv v účincích gliadinu na buňky. To je patrné z výsledků získaných ze stimulace myších BMDC, které postrádají oba funkční receptory – TLR2 i TLR4. U těchto BMDC byla detekována zcela minimální sekrece IL-1 $\beta$  po stimulaci gliadinem oproti hodnotám naměřeným u WT buněk. Navíc byla naměřená koncentrace IL-1 $\beta$  nižší než koncentrace IL-1 $\beta$  naměřená u BMDC TLR4<sup>-/-</sup> stimulovaných gliadinem. Také množství pro-IL-1 $\beta$  bylo u BMDC TLR2/4<sup>-/-</sup> stimulovaných gliadinem zcela minimální oproti množství pro-IL-1 $\beta$  detekovaného u TLR4<sup>-/-</sup> (obr. 22). Je tedy možné, že receptory TLR2 a TLR4 při aktivaci signálních drah řídících expresi pro-IL-1 $\beta$  u buněk stimulovaných gliadinem kooperují či je jejich signalizace vzájemně částečně zástupná. Interakce receptorů TLR2 a TLR4 již byla potvrzena v aktivaci signálních kaskád vyvolaných různými molekulami, jako jsou biglykan, protein teplotního šoku – HSP 60 nebo kyselina hyaluronová (Jiang *et al.*, 2005; Schaefer *et al.*, 2005; Vabulas *et al.*, 2001). Mechanismus kooperace TLR2 a TLR4 byl alespoň z části vysvětlen tak, že některé signální dráhy, které jsou aktivované vazbou ligandu na receptor TLR4, jsou závislé na přítomnosti funkčního receptoru TLR2 (Good *et al.*, 2012).

Podobné výsledky byly získány také ze stimulací PBMC izolovaných z periferní krve pacientů s neléčenou celiakií. Zde mělo použití neutralizační protilátky proti TLR4 výrazný vliv na sekreci IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem. Po stimulaci PBMC gliadinem v přítomnosti neutralizační protilátky proti TLR4 dosahovala naměřená koncentrace IL-1 $\beta$  v kultivačním médiu 30 % koncentrace IL-1 $\beta$  stanovené u PBMC stimulovaných pouze gliadinem. Použití neutralizační protilátky proti TLR2 v dané koncentraci naopak nemělo výrazný vliv na sekreci IL-1 $\beta$  u PBMC stimulovaných gliadinem (obr. 23). V dalších pokusech je nutné provést optimalizaci pokusů, především

vyzkoušet různé koncentrace obou protilátek. Zajímavé srovnání by jistě přineslo použití obou neutralizačních protilátek společně. Protože ani v případě použití neutralizační protilátky proti TLR4 nebyla inhibice sekrece IL-1 $\beta$  úplná, je pravděpodobné, že v buněčné signalizaci v odpovědi buněk na stimulaci gliadinem se uplatňují i jiné receptorové proteiny.

Role obou receptorů byla zkoumána různými skupinami a i podle jejich výsledků je možné předpokládat zapojení TLR4 i TLR2 v patogenezi celiakie. Bylo ukázáno, že střevní mukózní buňky pacientů s celiakií vykazují zvýšenou expresi receptorů TLR2 i TLR4 (Szebeni *et al.*, 2007). Stejně tak zvýšená exprese receptorů TLR2 i TLR4 byla stanovena u APC získaných z krve pacientů s celiakií (Cseh *et al.*, 2011). Publikovány byly také výsledky studie, podle kterých část autoprotiátek proti tkáňové transglutamináze, které jsou pro pacienty s celiakií typické, se váže na receptor TLR4 na povrchu monocytů, což vyvolává jejich aktivaci (Zanoni *et al.*, 2006).

V neposlední řadě jsou velmi podstatné i objevy z nedávné doby, které poukazují na to, že nejenom exprese pro-IL-1 $\beta$ , ale také exprese proteinu NLRP3 je nezbytným krokem, který umožňuje aktivaci inflamazómu u myších BMDC. Hlavní molekulou, která genovou expresi proteinu NLRP3 řídí, byl určen transkripční faktor NF- $\kappa$ B. A navíc bylo ukázáno, že BMDC postrádající funkční TLR4 nebo najednou obě molekuly MyD88 a TRIF nejsou po příslušné stimulaci schopné syntetizovat protein NLRP3, což podporuje představu významné úlohy signální kaskády TLR4/MyD88/TRIF/NF- $\kappa$ B v aktivaci inflamazómu. Bylo by zajímavé ověřit, zda i gliadin kromě exprese genu pro IL-1 $\beta$  stejnou signální kaskádou řídí i expresi proteinu NLRP3 (Bauernfeind *et al.*, 2009).

Jak už bylo zmíněno v úvodních kapitolách, IFN- $\gamma$  je jeden z nejvýznamnějších cytokinů, který se podílí na patogenezi celiakie. Zvýšené množství buněk produkujících IFN- $\gamma$  bylo stanoveno jak v intestinálních bioprátech, tak v periferní krvi pacientů s celiakií (Hansson *et al.*, 1999; Lahat *et al.*, 1999). Navíc bylo na vybraných liniích intestinálních epitelálních buněk ukázáno, že se citlivost receptoru TLR4 k jeho ligandům zvyšuje právě v prostředí IFN- $\gamma$  (Suzuki *et al.*, 2003). Pokud se tedy skutečně potvrdí role TLR4 jako receptoru pro gliadin, nabízí se potom možné vysvětlení zvýšené exprese a sekrece IL-1 $\beta$  u buněk pacientů s celiakií: IFN- $\gamma$ , který je produkován lymfocyty pacientů s celiakií, by zvyšoval citlivost monocytů a jiných APC k ligandům receptoru TLR4, tedy i gliadinu. V důsledku by tak u buněk pacientů s celiakií docházelo (na rozdíl od buněk zdravých dárců) k zvýšené syntéze pro-IL-1 $\beta$  a proteinu, jež je nezbytný pro jeho maturaci – NLRP3, jejichž exprese je řízena právě receptory TLR4.

## 7 Souhrn

Cílem předkládané diplomové práce bylo u monocytů a mononukleárních buněk periferní krve izolovaných od pacientů s celiakií stanovit produkci IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  po stimulaci buněk štěpeným gliadinem (významnou složkou lepku) a dále určit molekuly a mechanismy, které se v expresi, maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  uplatňují.

- 1) PBMC a monocyty izolované z krve pacientů s celiakií po stimulaci štěpeným gliadinem sekretují přibližně 2–3 krát vyšší množství IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  oproti buňkám zdravých dárců. Srovnatelná sekrece IL-1 $\beta$  u gliadinem stimulovaných PBMC a monocytů získaných z krve pacientů podporuje zjištění, že hlavním zdrojem IL-1 $\beta$  u celiakie jsou monocyty. Stanovení vyšší sekrece IL-1 $\alpha$  u PBMC než u monocytů naznačuje, že tento cytokin v odpovědi na stimulaci gliadinem produkují i další buňky imunitního systému.
- 2) Gliadin vyvolává u PBMC celiaků výraznou *de novo* syntézu pro-IL-1 $\beta$ . V dráze, která expresi pro-IL-1 $\beta$  řídí, jsou zapojeny kinázy rodiny MAPK – p38, JNK a ERK, a transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Jako jeden z možných receptorů gliadinu byl navržen TLR4. Na myších BMDC byla potvrzena role receptorů TLR2 a TLR4 a adaptorů MyD88 a TRIF v tomto ději. U PBMC celiaků se na maturaci pro-IL-1 $\beta$  podílí kaspáza-1. Kaspáza-1 se u PBMC nachází již v aktivovaném stavu a gliadin navíc způsobuje její další aktivaci, a to ve větší míře u pacientů než u zdravých dárců. Gliadinem indukovaná maturace a sekrece IL-1 $\beta$  je závislá na uvolňování draselných iontů z PBMC a zvýšené produkci ROS uvnitř buněk. V gliadinem indukované maturaci a sekreci IL-1 $\beta$  však nebyla potvrzena role kanálu P2X7, jež je řízen vazbou ATP. Na myších BMDC bylo navíc zjištěno, že gliadinem vyvolaná sekrece IL-1 $\beta$  je závislá kromě kaspázy-1 také na proteinu NLRP3 a ASC, proteinech inflamazómu NLRP3. Celkově tedy tyto výsledky nasvědčují možné roli inflamazómu NLRP3 v gliadinem vyvolaném zánětlivém procesu u pacientů trpících celiakií.

## 8 Použitá literatura

- Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, and Rubartelli A. 2004. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26):9745-9750.
- Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM *et al.* . 2000. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *The Journal of experimental medicine* 191(4):603-612.
- Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, and Abraham E. 2004. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *Journal of immunology* 172(4):2522-2529.
- Barton SH, and Murray JA. 2008. Celiac disease and autoimmunity in the gut and elsewhere. *Gastroenterology clinics of North America* 37(2):411-428, vii.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA *et al.* . 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology* 183(2):787-791.
- Bergamo P, Maurano F, D'Arienzo R, David C, and Rossi M. 2008. Association between activation of phase 2 enzymes and down-regulation of dendritic cell maturation by c9,t11-conjugated linoleic acid. *Immunology letters* 117(2):181-190.
- Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP *et al.* . 1988. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *The Journal of biological chemistry* 263(19):9437-9442.
- Brough D, and Rothwell NJ. 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of cell science* 120(Pt 5):772-781.
- Burns K, Martinon F, and Tschopp J. 2003. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Current opinion in immunology* 15(1):26-30.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, and Corazza GR. 2005. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and experimental immunology* 140(3):408-416.
- Cinová J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, Cerna M, Pecharova B, Dvorak M, Fruhauf P, Tlaskalova-Hogenova H, Smith PD, and Tuckova L. 2007. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *Journal of clinical immunology* 27(2):201-209.
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, and Fasano A. 2003. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 52(2):218-223.
- Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, and Cheronis J. 1999. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(11):6261-6266.
- Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, Ting JP, and Duncan JA. 2009. Staphylococcus aureus alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS one* 4(10):e7446.

- Creagh EM, and O'Neill LA. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology* 27(8):352-357.
- Cseh A, Vasarhelyi B, Szalay B, Molnar K, Nagy-Szakal D, Treszl A, Vannay A, Arato A, Tulassay T, and Veres G. 2011. Immune phenotype of children with newly diagnosed and gluten-free diet-treated celiac disease. *Digestive diseases and sciences* 56(3):792-798.
- Cummings JR, Cooney RM, Clarke G, Beckly J, Geremia A, Pathan S, Hancock L, Guo C, Cardon LR, and Jewell DP. 2010. The genetics of NOD-like receptors in Crohn's disease. *Tissue antigens* 76(1):48-56.
- Deem RL, Shanahan F, and Targan SR. 1991. Triggered human mucosal T cells release tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells. *Clinical and experimental immunology* 83(1):79-84.
- Di Sabatino A, and Corazza GR. 2009. Coeliac disease. *Lancet* 373(9673):1480-1493.
- Di Sabatino A, Pickard KM, Gordon JN, Salvati V, Mazzarella G, Beattie RM, Vossenkaemper A, Rovedatti L, Leakey NA, Croft NM *et al.* . 2007. Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology* 133(4):1175-1187.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, and Schuppan D. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine* 3(7):797-801.
- Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87(6):2095-2147.
- Dinarello CA. 1999. Interleukin-18. *Methods* 19(1):121-132.
- Dinarello CA. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14):3720-3732.
- Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I *et al.* . 2009. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* 4(8):e6510.
- Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, and Tschopp J. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320(5876):674-677.
- Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, and Ting JP. 2009. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *Journal of immunology* 182(10):6460-6469.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, and Flavell RA. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453(7198):1122-1126.
- Erickson RH, and Kim YS. 1990. Digestion and absorption of dietary protein. *Annual review of medicine* 41:133-139.
- Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, and Monteleone G. 2008. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut* 57(7):887-892.
- Fornari MC, Pedreira S, Niveloni S, Gonzalez D, Diez RA, Vazquez H, Mazure R, Sugai E, Smecuol E, Boerr L *et al.* . 1998. Pre- and post-treatment serum levels of cytokines IL-1beta, IL-6, and IL-1 receptor antagonist in celiac disease. Are they related to the associated osteopenia? *The American journal of gastroenterology* 93(3):413-418.
- Freche B, Reig N, and van der Goot FG. 2007. The role of the inflammasome in cellular responses to toxins and bacterial effectors. *Seminars in immunopathology* 29(3):249-260.

- Furst DE. 2004. Anakinra: review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical therapeutics* 26(12):1960-1975.
- Garrote JA, Gomez-Gonzalez E, Bernardo D, Arranz E, and Chirido F. 2008. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 47 Suppl 1:S27-32.
- Gattorno M, Tassi S, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, D'Ossualdo A, Buoncompagni A, Alpighiani MG, Alessio M *et al.* . 2007. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis and rheumatism* 56(9):3138-3148.
- Ghaemi-Oskouie F, and Shi Y. 2011. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Current rheumatology reports* 13(2):160-166.
- Good DW, George T, and Watts BA, 3rd. 2012. Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb. *The Journal of biological chemistry* 287(24):20208-20220.
- Guandalini S, and Melin-Rogovin M. 2002. Celiac Disease: Myths and Facts. [http://theglutensyndrome.net/Celiac\\_Myths\\_FactsGuandalini\\_002799.pdf](http://theglutensyndrome.net/Celiac_Myths_FactsGuandalini_002799.pdf) (k 10.8. 2012)
- Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M, and Corr M. 2009. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis and rheumatism* 60(12):3642-3650.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, and Golenbock DT. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 9(8):857-865.
- Halstensen TS, Scott H, Fausa O, and Brandtzaeg P. 1993. Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4+ T cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia. *Scandinavian journal of immunology* 38(6):581-590.
- Hansson T, Dannaeus A, and Klareskog L. 1999. Cytokine-producing cells in peripheral blood of children with coeliac disease secrete cytokines with a type 1 profile. *Clinical and experimental immunology* 116(2):246-250.
- Harris KM, Fasano A, and Mann DL. 2008. Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *Journal of immunology* 181(7):4457-4460.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, and Khosla C. 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 283(4):G996-G1003.
- Hazuda DJ, Strickler J, Kueppers F, Simon PL, and Young PR. 1990. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *The Journal of biological chemistry* 265(11):6318-6322.
- Heap GA, and van Heel DA. 2009. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Seminars in immunology* 21(6):346-354.
- Hentze H, Lin XY, Choi MS, and Porter AG. 2003. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell death and differentiation* 10(9):956-968.
- Hewinson J, Moore SF, Glover C, Watts AG, and MacKenzie AB. 2008. A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *Journal of immunology* 180(12):8410-8420.



- Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, and Fitzgerald KA. 2009. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* 5(5):487-497.
- Hogquist KA, Unanue ER, and Chaplin DD. 1991. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *Journal of immunology* 147(7):2181-2186.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, and Latz E. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9(8):847-856.
- Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N *et al.* . 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21(3):367-377.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M *et al.* . 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599-603.
- Cherňavský AC, Paez MC, Periolo N, Correa P, Guillen L, Niveloni SI, Maurino E, Bai JC, and Anaya JM. 2008. The simultaneous presence of IL-1B and TNFA two-positions risk haplotypes enhances the susceptibility for celiac disease. *Cytokine* 42(1):48-54.
- Chládková B, Kamanova J, Palova-Jelinkova L, Cinova J, Sebo P, and Tuckova L. 2011. Gliadin fragments promote migration of dendritic cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 15(4):938-948.
- Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, and Iwasaki A. 2009. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *The Journal of experimental medicine* 206(1):79-87.
- Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, and Tschopp J. 1995. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine* 181(5):1917-1922.
- Jabri B, and Sollid LM. 2009. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature reviews Immunology* 9(12):858-870.
- Jelínková L, Tuckova L, Cinova J, Flegelova Z, and Tlaskalova-Hogenova H. 2004. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS letters* 571(1-3):81-85.
- Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA *et al.* . 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature medicine* 11(11):1173-1179.
- Jin C, and Flavell RA. 2010. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of clinical immunology* 30(5):628-631.
- Junker Y, Leffler DA, Wieser H, and Schuppan D. 2009. Gliadin activates monocytes, macrophages and dendritic cells *in vitro* and *in vivo* via Toll like receptor 4. *Gastroenterology* 136, A468.
- Kagnoff MF. 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of clinical investigation* 117(1):41-49.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, and Nunez G. 2007. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26(4):433-443.
- Kapur V, Majesky MW, Li LL, Black RA, and Musser JM. 1993. Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1 beta) precursor to produce active IL-1 beta by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(16):7676-7680.

- Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF *et al.* . 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16(4):559-569.
- Kastner DL, Aksentijevich I, and Goldbach-Mansky R. 2010. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. *Cell* 140(6):784-790.
- Keller M, Ruegg A, Werner S, and Beer HD. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132(5):818-831.
- Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, Jang MH, Saitoh T, Akira S, and Kawai T. 2009. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *Journal of immunology* 183(12):8061-8067.
- Kumar V, Wijmenga C, and Withoff S. 2012. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Seminars in immunopathology* 34(4):567-580.
- Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, and Lerner A. 1999. Cytokine profile in coeliac disease. *Scandinavian journal of immunology* 49(4):441-446.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, and Nunez G. 2007. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 82(2):220-225.
- Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, and Dixit VM. 2009. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *The Journal of cell biology* 187(1):61-70.
- Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shear-Donohue T, Tamiz A, Alkan S *et al.* . 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135(1):194-204 e193.
- Li Q, Valerio MS, and Kirkwood KL. 2012. MAPK usage in periodontal disease progression. *Journal of signal transduction* 2012:308943.
- Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, and Rachmilewitz D. 1990. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. *Gut* 31(6):686-689.
- Lionetti E, and Catassi C. 2011. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International reviews of immunology* 30(4):219-231.
- Luciani A, Villella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S *et al.* . 2010. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 59(3):311-319.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, and Surprenant A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15(5):825-835.
- Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S, and Beyaert R. 2008. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *The Journal of experimental medicine* 205(9):1967-1973.
- Mahida YR, Wu K, and Jewell DP. 1989. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30(6):835-838.

- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, and Londei M. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362(9377):30-37.
- Mamone G, Ferranti P, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O, Malorni A, and Addeo F. 2007. Identification of a peptide from alpha-gliadin resistant to digestive enzymes: implications for celiac disease. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 855(2):236-241.
- Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, Ciaccio E, Minaya MT, Green PH, and Bhagat G. 2010. Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Human immunology* 71(1):50-57.
- Marsh MN. 1990. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 31(1):111-114.
- Martinon F, Agostini L, Meylan E, and Tschopp J. 2004. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current biology* : CB 14(21):1929-1934.
- Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Menard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G *et al.* . 2008. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of experimental medicine* 205(1):143-154.
- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E *et al.* . 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125(3):730-745.
- Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E *et al.* . 2006. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *The Journal of experimental medicine* 203(5):1343-1355.
- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T *et al.* . 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21(3):357-366.
- Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoheh N, Griffiths G, Moita LF, and Anes E. 2010. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cellular microbiology* 12(8):1046-1063.
- Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, and Kupper TS. 1991. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *The Journal of experimental medicine* 174(4):821-825.
- Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, and Lundin KE. 1997. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scandinavian journal of immunology* 46(3):103-109.
- Monteleone G, Pender SL, Wathen NC, and MacDonald TT. 2001. Interferon-alpha drives T cell-mediated immunopathology in the intestine. *European journal of immunology* 31(8):2247-2255.
- Nadiri A, Wolinski MK, and Saleh M. 2006. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *Journal of immunology* 177(7):4239-4245.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I *et al.* . 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113(10):2324-2335.

- Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, and Joosten LA. 2010. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS pathogens* 6(2):e1000661.
- Nickel W, and Rabouille C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews Molecular cell biology* 10(2):148-155.
- Niemi K, Teirila L, Lappalainen J, Rajamaki K, Baumann MH, Oorni K, Wolff H, Kovanen PT, Matikainen S, and Eklund KK. 2011. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *Journal of immunology* 186(11):6119-6128.
- Nikulina M, Habich C, Flohe SB, Scott FW, and Kolb H. 2004. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *Journal of immunology* 173(3):1925-1933.
- Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, and Brandtzaeg P. 1998. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 115(3):551-563.
- Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C *et al.* . 2006. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 55(6):803-808.
- O'Neill LA. 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological reviews* 226:10-18.
- Oberhuber G, Granditsch G, and Vogelsang H. 1999. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *European journal of gastroenterology & hepatology* 11(10):1185-1194.
- Palová-Jelínková L, Rozkova D, Pecharova B, Bartova J, Sediva A, Tlaskalova-Hogenova H, Spisek R, and Tuckova L. 2005. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Journal of immunology* 175(10):7038-7045.
- Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, and Banchereau J. 2005. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of experimental medicine* 201(9):1479-1486.
- Pazár B, Ea HK, Narayan S, Kolly L, Bagnoud N, Chobaz V, Roger T, Liote F, So A, and Busso N. 2011. Basic calcium phosphate crystals induce monocyte/macrophage IL-1beta secretion through the NLRP3 inflammasome in vitro. *Journal of immunology* 186(4):2495-2502.
- Pedra JH, Cassel SL, and Sutterwala FS. 2009. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Current opinion in immunology* 21(1):10-16.
- Pelegriin P, and Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* 25(21):5071-5082.
- Pelegriin P, and Surprenant A. 2007. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 282(4):2386-2394.
- Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, and MacDonald TT. 1997. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *Journal of immunology* 158(4):1582-1590.
- Perregaux D, and Gabel CA. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of biological chemistry* 269(21):15195-15203.

- Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, and Tschopp J. 2007. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* 14(9):1583-1589.
- Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, and Rubartelli A. 2008. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(23):8067-8072.
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandona D, Savaglio E, and Di Virgilio F. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109(9):3856-3864.
- Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J, and Crovella S. 2010. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 43(8):583-589.
- Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A, and Crovella S. 2011. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *The American journal of gastroenterology* 106(3):539-544.
- Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, and Sollid LM. 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *Journal of immunology* 173(3):1757-1762.
- Qu Y, Franchi L, Nunez G, and Dubyak GR. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology* 179(3):1913-1925.
- Rajamäki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, and Eklund KK. 2010. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PloS one* 5(7):e11765.
- Rajan JV, Rodriguez D, Miao EA, and Aderem A. 2011. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. *Journal of virology* 85(9):4167-4172.
- Rakhimová M, Esslinger B, Schulze-Krebs A, Hahn EG, Schuppan D, and Dieterich W. 2009. In vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells by peptic-tryptic digest of gliadin is independent of genetic predisposition and the presence of celiac disease. *Journal of clinical immunology* 29(1):29-37.
- Ráki M, Tollefsen S, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM, and Jahnsen FL. 2006. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology* 131(2):428-438.
- Reif S, and Lerner A. 2004. Tissue transglutaminase-the key player in celiac disease: a review. *Autoimmunity reviews* 3(1):40-45.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, and Raedler A. 1993. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and experimental immunology* 94(1):174-181.
- Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, and Jabri B. 2001. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *Journal of immunology* 167(10):5527-5530.

- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, and Sitia R. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal* 9(5):1503-1510.
- Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, Martin J, and Koeleman BP. 2005. Association study of functional genetic variants of innate immunity related genes in celiac disease. *BMC medical genetics* 6:29.
- Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, and Monteleone G. 2002. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 50(2):186-190.
- Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, and Khosla C. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297(5590):2275-2279.
- Shaw PJ, McDermott MF, and Kanneganti TD. 2011. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends in molecular medicine* 17(2):57-64.
- Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M *et al.* . 2005. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of clinical investigation* 115(8):2223-2233.
- Schönbeck U, Mach F, and Libby P. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *Journal of immunology* 161(7):3340-3346.
- Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, and Schulzke JD. 2008. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* 57(6):747-754.
- Silano M, Vincentini O, Maialetti F, and Vincenzi MD. 2005. Induction of tissue transglutaminase expression by gliadin peptides in a human intestinal epithelial cell line: Pg1-09. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 40(5):635-636
- Silano M, Volta U, Vincenzi AD, Dessi M, Vincenzi MD, and Collaborating Centers of the Italian Registry of the Complications of Coeliac D. 2008. Effect of a gluten-free diet on the risk of enteropathy-associated T-cell lymphoma in celiac disease. *Digestive diseases and sciences* 53(4):972-976.
- Sollid LM. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature reviews Immunology* 2(9):647-655.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, and Thorsby E. 1989. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *The Journal of experimental medicine* 169(1):345-350.
- Sorbara MT, and Girardin SE. 2011. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell research* 21(4):558-560.
- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS *et al.* . 2006. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *The American journal of gastroenterology* 101(10):2333-2340.
- Stepniak D, and Koning F. 2006. Celiac disease-sandwiched between innate and adaptive immunity. *Human immunology* 67(6):460-468.
- Stylianou E, and Saklatvala J. 1998. Interleukin-1. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30(10):1075-1079.
- Suzuki M, Hisamatsu T, and Podolsky DK. 2003. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the

- intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infection and immunity* 71(6):3503-3511.
- Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vasarhelyi B, Korponay-Szabo IR, Tulassay T, and Arato A. 2007. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 45(2):187-193.
- Tassi S, Carta S, Vene R, Delfino L, Ciriolo MR, and Rubartelli A. 2009. Pathogen-induced interleukin-1beta processing and secretion is regulated by a biphasic redox response. *Journal of immunology* 183(2):1456-1462.
- Terrazzano G, Sica M, Gianfrani C, Mazarella G, Maurano F, De Giulio B, de Saint-Mezard S, Zanzi D, Maiuri L, Londei M *et al.* . 2007. Gliadin regulates the NK-dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization. *Journal of immunology* 179(1):372-381.
- Thomas KE, Sapone A, Fasano A, and Vogel SN. 2006. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *Journal of immunology* 176(4):2512-2521.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J *et al.* . 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768-774.
- Troncone R, and Jabri B. 2011. Coeliac disease and gluten sensitivity. *Journal of internal medicine* 269(6):582-590.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G *et al.* . 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature genetics* 43(12):1193-1201.
- Tschopp J, and Schroder K. 2010. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews Immunology* 10(3):210-215.
- Tučková L, Novotna J, Novak P, Flegelova Z, Kveton T, Jelinkova L, Zidek Z, Man P, and Tlaskalova-Hogenova H. 2002. Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *Journal of leukocyte biology* 71(4):625-631.
- Uematsu S, and Fujimoto K. 2010. The innate immune system in the intestine. *Microbiology and immunology* 54(11):645-657.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, and Wagner H. 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry* 276(33):31332-31339.
- van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK *et al.* . 2007. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature genetics* 39(7):827-829.
- van Heel DA, and West J. 2006. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 55(7):1037-1046.
- Ventura A, Magazzu G, and Greco L. 1999. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117(2):297-303.

- Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U, Gruppo Italiano Patologi Apparato D, and Societa Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology Id. 2011. Coeliac disease: the histology report. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 43 Suppl 4:S385-395.
- Ward JR, West PW, Ariaans MP, Parker LC, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I, and Wilson HL. 2010. Temporal interleukin-1beta secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 285(30):23147-23158.
- Zambetti LP, Laudisi F, Licandro G, Ricciardi-Castagnoli P, and Mortellaro A. 2012. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation ... and a lot more. *Immunologic research* 53(1-3):78-90.
- Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R *et al.* . 2006. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS medicine* 3(9):e358.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, and Tschopp J. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology* 11(2):136-140.
- Zubiaga AM, Munoz E, and Huber BT. 1991. Production of IL-1 alpha by activated Th type 2 cells. Its role as an autocrine growth factor. *Journal of immunology* 146(11):3849-3856.
- Zúñiga-Pflücker JC, Jiang D, and Lenardo MJ. 1995. Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 268(5219):1906-1909.