

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Imunitná odpoveď jednotlivých subpopulácií  
dendritických buniek na probiotický kmeň  
*E. coli* O83:K24:H31**

**Immune response of different subpopulations of  
dendritic cells to probiotic strain of *E. coli* O83:K24:H31**

Bc. Miroslava Gorelová

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Praha, 2018

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Hrdého, Ph.D. a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.1.2018

.....  
Miroslava Gorelová

## **POĎAKOVANIE**

V prvom rade by som sa chcela poďakovať RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za veľkú trpezlivosť, cenné rady a obetavú pomoc kedykoľvek som potrebovala. Ďalej by som sa chcela poďakovať kolektívu imunologického laboratória na 1. lekárskej fakulte UK , kde som vypracovávala svoju diplomovú prácu; za ich veľkú pomoc so spracovávaním vzoriek a pri metódach analýzy ELISA testom. Ďalej by som sa chcela poďakovať i kolegom v práci za ich rady a veľkú pomoc ohľadne výsledkov. Veľké ďakujem patrí mojej rodine a snúbencovi, ktorí mi boli oporou po celú dobu nie len štúdia, ale aj vzniku tejto práce.

Táto práca bola podporovaná grantom Ministerstva zdravotníctva Českej Republiky, grant číslo AZV CR 15-26877A, grantami Univerzity Karlovej (výskumné programy PRVOUK P25/LF1/2, Progres Q25/LF1, grant UNCE 204017 a SVV 260 369).

## ABSTRAKT

Alergia, ako jedna z celosvetovo najčastejších patológií, patrí k ochoreniam s neustále sa zvyšujúcim výskytom aj u malých detí. U geneticky predisponovaných jedincov sú dendritické bunky schopné po kontakte s alergénom polarizovať imunitnú odpoveď Th2 smerom. Jedným z možných preventívnych opatrení zamedzujúcich rozvoj či vznik alergických ochorení môže byť skoré postnatálne podávanie probiotík. Ukázalo sa, že podávanie vybraných probiotických kmeňov či zmesi môžu zabrániť vzniku alergií. V diplomovej práci sa testovala schopnosť probiotického kmeňa *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83) na podporu maturácie dendritických buniek (DC; Dendritic Cell) a polarizáciu imunitných odpovedí. Podávanie tejto probiotickej vakcíny, nazývanej Colinfant Newborn, sa javí ako vhodné preventívne opatrenie na zníženie incidencie alergických ochorení u detí s predispozíciou k vzniku alergie.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo sledovať schopnosť *E. coli* O83 podporovať maturáciu dvoch hlavných subpopulácií DC (myeloidných dendritických buniek – mDC a plazmacytoidných dendritických buniek – pDC) pupočníkovej krvi novorodencov zdravých matiek (detí s relatívne nízkym rizikom vzniku alergie) a alergických matiek (detí s relatívne vysokým rizikom vzniku alergie) a meraná metódou prietokovej cytometrie. Bolo testované zastúpenie jednotlivých cytokínov a transkripčných faktorov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov (Th1, Th2, Th17 a regulačných T buniek – Treg) pomocou prietokovej cytometrie po kokultivácii DC stimulovaných *E. coli* O83 s naivnými CD4<sup>+</sup> bunkami.

Výsledky ukazujú podstatne vyššiu prítomnosť aktivačného markeru CD83 na mDC po stimulácii *E. coli* O83 u detí alergických matiek v porovnaní s deťmi zdravých matiek. Podobné výsledky boli získané aj u pDC, ale nedosiahli štatistickú významnosť.

Vyššia expresia aktivačného znaku CD83 na stimulovaných mDC a vyššia prítomnosť intracelulárnych cytokínov u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s mDC stimulovanými probiotickým kmeňom *E. coli* O83 bola pozorovaná u detí alergických matiek. U pDC neboli prítomné žiadne významné rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou. Po kokultivácii pDC stimulovaných *E. coli* O83 s CD4<sup>+</sup> došlo k významnému zvýšeniu produkcie IL-10 a IL-17A u CD4<sup>+</sup> T bunkách u detí zdravých matiek v porovnaní s CD4<sup>+</sup> T bunkami kultivovanými s nestimulovanými DC. Môžeme povedať, že *E. coli* O83 indukuje maturáciu DC a produkciu IL-10 u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC.

Deti alergických matiek majú všeobecne zvýšenú reaktivitu ako DC, tak CD4<sup>+</sup> T buniek, ktoré spolu so zníženou hladinou IL-10 u detí alergických matiek mohli podporiť rozvoj nevhodných imunitných odpovedí po stretnutí s antigénom.

**Kľúčové slová:** alergia, pupočníková krv, *E. coli* O83, deti zdravých matiek, deti alergických matiek, dendritické bunky, myeloidné dendritické bunky, plazmacytoidné dendritické bunky.

## ABSTRACT

Allergy, as one of the worldwide most frequent pathologies, belongs to illnesses with constantly growing incidence among young children. In genetically predisposed individuals, dendritic cells are able to polarize the immune response of Th2 in contact with the allergen. Postnatal probiotic supplementation could be one the preventive measure to prevent the development of allergic diseases. It has been shown that introduction of selected probiotic strains or mixtures can prevent development of allergy. In this diploma thesis, the capacity of probiotic strain *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83) to support maturation of dendritic cells (DC) and polarization of immune responses was tested. Introduction of this probiotic vaccine called Colinfant Newborn appears to be suitable preventive measure, lowering allergy incidence in children with predisposition to development of allergy.

The aim of this diploma thesis was to observe capacity of *E. coli* O83 to support maturation of the two main subpopulations of dendritic cells (myeloid dendritic cells – mDC and plasmacytoid dendritic cells – pDC) in cord blood of newborns of healthy mothers (children with relatively low risk for allergy development) and allergic mothers (children with relatively high risk for allergy development). To achieve this goal, flow cytometry was employed. The presence of individual cytokines and transcription factors characteristic for particular subpopulations of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells – Treg) was detected by flow cytometry in CD4<sup>+</sup> T cells after cocultivation with DC stimulated *E. coli* O83 naive CD4<sup>+</sup> cells.

Results show significantly higher expression of activation marker CD83 on mDC stimulated with *E. coli* O83 in children of allergic mothers in comparison with healthy mothers was determined. Similar results were obtained for pDC but it does not reach statistical significance.

Generally higher expression of activation marker CD83 on stimulated mDC and increased intracellular presence of cytokines in CD4<sup>+</sup> T cells cocultured with DC stimulated with probiotic strain *E. coli* O83 of children of allergic mothers was observed. There was no significant difference between healthy and allergic groups in pDC. After cocultivation of *E. coli* O83 stimulated pDC with CD4<sup>+</sup>, a significantly increased levels of IL-10 and IL-17A were detected in CD4<sup>+</sup> T cells of children of healthy mothers in comparison with CD4<sup>+</sup> T cells cultivated with non-stimulated DC. We can conclude that *E. coli* O83 induces maturation of DC and production of IL-10 in pDC.

Generally higher reactivity of DC as well as CD4<sup>+</sup> T cells itself together with decreased IL-10 levels in children of allergic mothers could support development of undesired immune responses after contact with antigen.

**Keywords:** allergy, cord blood, *E. coli* O83, children of healthy mothers, children of allergic mothers, dendritic cells, myeloid dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells.

## ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

- Obr. 1. Imunitné mechanizmy slizničnej steny, ktoré obmedzujú kontakt medzi črevnou mikrobiotou a bunkovým povrchom epitelu
- Obr. 2. Vývoj hematopoetickej kmeňovej bunky do dvoch línií – lymfoidnej a myeloidnej
- Obr. 3. Schematické znázornenie vývoja ľudských dendritických buniek z CD34+ myeloidných a lymfoidných progenitorov
- Obr. 4. Interakcia medzi APC a T-lymfocytom
- Obr. 5. Signály nevyhnutné pri rozpoznávaní T buniek
- Obr. 6. Cesty diferenciácie, expresia transkripčných faktorov a cytokínový profil rôznych subpopulácií CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov
- Obr. 7. Získaná frakcia mononukleárných leukocytov po centrifugácii
- Obr. 8. Bürkerová komôrka.
- Obr. 9. Gateovacia stratégia mDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou
- Obr. 10. Gateovacia stratégia pDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.
- Obr. 11. Porovnanie mDC a pDC detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 s nestimulovanou kontrolou
- Obr. 12. Meranie transkripčných faktorov a cytokínov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov kokultivovaných mDC/pDC stimulovanými *E. coli* O83
- Obr. 13. Vplyv stimulácie mDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie
- Obr. 14. Vplyv stimulácie pDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie
- Obr. 15. Produkcia cytokínov dendritickými bunkami u detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 v porovnaní s kontrolou



- Tab. 1. TLR a ich ligandy
- Tab. 2. Zoznam použitých prístrojov
- Tab. 3. Zoznam použitých chemikálií, stimulantov a komerčných súprav
- Tab. 4. Zoznam použitých roztokov pre bunkové kultúry
- Tab. 5 – 7. Protilátky použité pri analýze na prietokovom cytometri
- Tab. 8. Riedenia vzoriek použité pri ELISA
- Tab. 9. Cytokíny použité pri ELISA

## ZOZNAM SKRATIEK

A	Alergický/-é/-ých (deti alergických matiek)
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytolysis – bunkami sprostredkovaná cytotoxicita závislá od protilátky
AMP's	Antimicrobial peptides
APC	Antigen-Presenting Cell – bunky prezentujúce antigén
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen – znak charakteristický pre DC
BIR	Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat
Btk	Bruton's tyrosine kinase – Brutonova tyrozín kináza
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domains
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells – mononukleárne bunky pupočníkovej krvi
CD	Cluster of Differentiation
CpG DNA	Úseky v reťazci bakteriálnej DNA, kde v lineárnej sekvencii DNA sa cytozín (C) nachádza vedľa guanínu (G)
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CSF	Colony Stimulating Factor – rastový faktor leukocytov
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CD152) – cytotoxický antigén asociovaný s T-lymfocytmi
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic Cells – dendritické bunky
DC-SIGN	DC-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin
dsRNA	Double-Stranded RNA – dvojvláknová RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	Eosinophil Chemotactic Factor – eozinofilný chemotaktický faktor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Flt3L	Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand
FMO	Fluorescence Minus One
GIT	Gastrointestinálny trakt
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – faktor stimulujúci kolónie granulocytov/kolónie makrofágov
HCS	Hematopoietic Stem Cells – hematopoetické kmeňové bunky
IBD	Inflammatory Bowel Disease – zápalové ochorenia čriev

ICAM	Intercellular Adhesion Molecule – intracelulárna adhezívna molekula z imunoglobulínovej rodiny
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukín
ILC	Innate Lymphoid Cells – vrodené (prirodzené) lymfoidné bunky
IRF	Interferon Regulatory Factor
JAM	Junctional Adhesion Molecules
LAC	Leukocyte Activation Cocktail
LDL	Low-Density Lipoprotein
LFA	Lymphocyte-Function-Associated Antigen
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LPS	Lipopolysacharid
LRR	Leucine-Rich Repeats – oblasti bohaté na leucín
M cell	Microfold Cells
mDC	Myeloid Dendritic Cells – myeloidné dendritické bunky
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue – slizničné lymfatické tkanivo
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern – molekulový vzor súvisiaci s mikróboom
MBL	Mannose-Binding Lectin – lektín viažúci manózu
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Gene 5
MDP	Muramyldipeptid
ME	$\beta$ - Merkptoethanol
MHC	Major Histocompatibility Complex – hlavný histokompatibilný komplex
MIIC	MHC-II. Rich Compartments
MyD88	Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88
NACHT	ABC oblasť v NOD doméne
NAIP	NLR Family of Apoptosis Inhibitory Protein
NCF	Neutrophil Chemotactic Factor – neutrofilný chemotaktický faktor
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappaB
NLR	NOD-Like Receptors
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
OVA	Ovalbumin
PAF	Platelet-Activating Factor – faktor aktivujúci trombocyty

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern – molekulový vzor súvisiaci s patogénom
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cells – plazmacytoidné dendritické bunky
p/MHC	komplex peptid-MHC
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell – periférne mononukleárne bunky
PD-L	Programmed Death-Ligand
Poly I:C	Polyinosinic:Polycytidylic Acid
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PYD	Pyrin Doména
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RIG-I	Retinoic Acid-Inducible Gene I.
RIP	Receptor-Interacting Protein
RLR	RIG-I-Like Receptor
SR	Scavenger Receptor
ssRNA	Single-Stranded RNA – jednovláknová RNA
TAP	Transporter Associated With Antigen Processing
Tc	Cytotoxic T Cells – cytotoxické T bunky
TCR	T-cell Receptor – T bunkový receptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$ – transformujúci rastový faktor $\beta$
Th	T helper Cells – pomocné T bunky
TIR	Toll/IL-1R doména
TJ	Tight Junction – tesné spoje
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ – faktor nádorovej nekrózy $\alpha$
Treg	Regulatory T Cell – T regulačné lymfocyty
TRIF	TIR-Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN- $\beta$ – TIR doména obsahujúca adaptorový proteín IFN- $\beta$
Z	Zdravý/-é/-ých (deti zdravých matiek)
ZO-1	Zonula Occludens

## OBSAH

1	ALERGIA A MIKROBIOTA U ČLOVEKA .....	17
1.1	Hypersenzitívne reakcie, alergia .....	17
1.2	Atopia .....	20
1.3	Anafylaxia .....	20
1.4	Slizničný imunitný systém .....	21
1.5	Mikrobiota .....	23
1.6	Probiotiká a ich charakteristika .....	24
1.6.1	Prebiotiká .....	25
1.6.2	Probiotická vakcína „ <i>Colinfant Newborn</i> “ .....	25
2	DENDRITICKÉ BUNKY .....	27
2.1	Objavenie dendritických buniek .....	27
2.2	Vývoj dendritických buniek .....	27
2.3	Úloha DC v imunitnom systéme .....	29
2.3.1	Pohlcovanie a spracovanie antigénu .....	31
2.3.2	Morfológia dendritických buniek .....	33
2.3.3	Migrácia dendritických buniek .....	34
2.3.4	Expresia molekúl .....	34
2.3.5	Produkcia cytokínov .....	35
2.3.6	Subpopulácie naivných CD4 <sup>+</sup> T-lymfocytov .....	38
2.3.7	Schopnosť rozoznávať patogény - Pattern-recognition receptors PRR .....	41
2.4	Subpopulácie dendritických buniek .....	47
2.4.1	Myeloidné dendritické bunky (mDC) .....	47
2.4.2	Plazmacytoïdné dendritické bunky (pDC) .....	48
3	MATERIÁLY A METÓDY .....	50
3.1	Prístroje .....	50

3.2	Roztoky, chemikálie a komerčné súpravy .....	51
3.2.1	Roztoky používané pri intracelulárnom farbení buniek .....	52
3.2.2	Roztoky používané pri detekcii cytokínov ELISA testom .....	53
3.2.3	Médiá a roztoky pre tkanivové kultúry .....	54
3.3	Protilátky .....	55
3.4	Použité programy .....	55
3.5	Metodika .....	56
3.5.1	Získavanie a izolácia mononukleárnych buniek z pupočníkovej krvi (CBMC).....	56
3.5.2	Počítanie buniek.....	57
3.5.3	Separácia mDC pomocou magnetických guľičiek .....	58
3.5.4	Separácia CD34 <sup>+</sup> pomocou magnetických guľičiek.....	59
3.5.5	Separácia CD4 <sup>+</sup> pomocou magnetických guľičiek.....	61
3.5.6	Intracelulárne farbenie buniek .....	61
3.5.7	ELISA .....	63
4	CIELE PRÁCE.....	66
5	VÝSLEDKY.....	67
5.1	<i>E. coli</i> O83 zvyšuje percento CD83 <sup>+</sup> mDC.....	67
5.2	Porovnanie mDC a pDC u skupín detí zdravých a alergických matiek po stimulácii <i>E. coli</i> O83.....	70
5.3	Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných <i>E. coli</i> O83 s naivnými CD4 <sup>+</sup> T bunkami .....	71
5.3.1	Transkripčné faktory a cytokíny charakteristické pre dané subpopulácie .....	72
5.4	Stimulácia probiotickým kmeňom <i>E. coli</i> O83 zvyšuje produkciu cytokínov v supernatante kultúr mDC .....	79
6	DISKUSIA .....	81
	ZÁVER .....	88
	PRÍLOHA 1 .....	89

PRÍLOHA 2 .....	91
PRÍLOHA 3 .....	92
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	94

## ÚVOD

Dendritické bunky predstavujú veľmi dôležitú súčasť imunitného systému. Jedná sa o bunky prezentujúce antigén (Antigen-Presenting Cell; APC). APC predstavujú prepojenie medzi mechanizmami antigénne nešpecifickej (prirodzenej, vrodenej) a antigénne špecifickej (adaptívnej, získanej) imunity. Ich schopnosťou je aktivovať naivné, efektorové či pamäťové T-lymfocyty a tým spustiť efektívnu imunitnú odpoveď proti patogénnym organizmom; taktiež bola popísaná ich úloha v protinádorovej odpovedi, u autoimunitných ochorení či alergiách, z čoho vyplýva ich dôležitá rola v indukcii tolerancie [1,2].

V prípade porušenej funkcie DC sa môžu v priebehu niektorých ochorení podieľať na ich patogenéze a ovplyvniť tak klinický stav pacienta. Nadmerná reakcia DC môže viesť k rozvoju autoimunitných procesov a ich znížená funkcia naproti tomu zase môže prispievať k nádorovému bujneniu a býva príčinou opakovaných infekcií. V prípade, že sa podarí objasniť úlohu DC pri imunopatologických stavoch je možné toto poznanie využiť pri navrhovaní vhodnej terapie [1,2].

Cieľom diplomovej práce je porovnať reaktivitu myeloidných a plazmacytoidných dendritických buniek v puočníkovej krvi novorodencov zdravých (detí s relatívne nízkym rizikom rozvoja alergie) a alergických matiek (detí s vysokým rizikom vzniku alergie). Ďalej schopnosť týchto DC polarizovať imunitnú odpoveď a nakoniec vplyv probiotického kmeňa *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83) obsiahnutej v probiotickej vakcíne Colinfant Newborn na maturáciu DC novorodencov a následnú polarizáciu imunitnej odpovede.

Celá práca je členená do šiestich kapitol. Úvodná kapitola a jej podkapitoly sa venujú stručnej a všeobecnej charakteristike alergii a črevnému imunitnému systému, ktorý sa začína vyvíjať hneď po pôrode. Kapitola druhá sa zaoberá DC a ich dôležitým postavením v imunitnom systéme, ich vlastnosťami a ich subpopuláciami. Materiál a prístroje použité počas jednotlivých analýz sú uvedené v tretej kapitole. Veľmi dôležitou súčasťou je príprava každého roztoku a média pre bunkové kultúry a postupy práce používané pri analýzach, ktoré sú rovnako obsiahnuté v tejto kapitole. Výsledkami experimentov a analýz z prietokovej cytometrie sa venuje piata kapitola. Diskutovaniu týchto výsledkov porovnávaním s inými prácami sa venuje posledná, šiesta kapitola.



# 1 ALERGIA A MIKROBIOTA U ČLOVEKA

## 1.1 Hypersenzitívne reakcie, alergia

Alergia je definovaná ako hypersenzitívny stav, kedy imunitný systém človeka reaguje na látky v prostredí, ktoré sú relatívne neškodné pre väčšinu ľudí. Tieto látky sú známe ako alergény. V okolí dieťaťa sa vyskytuje široká škála alergénov: roztoče, plesne, srst', peľ, hmyz, potraviny, .... Existuje mnoho rôznych príčin vzniku alergií a symptómy sa líšia od miernych až po život ohrozujúce stavy. Alergické príznaky sa začínajú objavovať už v skorom rannom veku, u dojčiat, pričom trvá približne 3 až 5 rokov kým sa nerozvinie u jedinca alergia [3].

Imunopatologické reakcie môžeme podľa Coombsa a Gella rozdeliť do 4 typov na základe mechanizmu:

- ❖ Reakcia I. typu: Alergén indukuje imunitnú odpoveď, pri ktorej vznikajú protilátky typu IgE. Svojím Fc-fragmentom sa viažu na svoj vysokoafinitný receptor (FcεRI) v membránach mastocytov a bazofilov. Keď sa senzibilizovaný jedinec dostane do kontaktu s alergénom, dochádza k interakcii alergénu s naviazanými protilátkami, čo spôsobí degranuláciu buniek a uvoľneniu biologických látok, pričom najdôležitejší je histamín, ktorý v okolí spôsobuje vazodilatáciu a zvyšuje permeabilitu ciev. Jedná sa o reakciu žírnych buniek (mastocytov), ktoré sú aktivované naviazaním alergénu na IgE.

Príkladom tohto typu je alergická rinitída.

- ❖ Reakcia II. typu: Ide o cytotoxickú reakciu, ktorú sprostredkujú protilátky IgG a IgM. Je charakterizovaná antigén-protilátkovou interakciou (rovnako tak i reakcia I. a III. typu), čo vyúsťuje do lokálnej produkcie anafylatoxínu (C5a), uvoľnenie chemotaxínov pre polymorfonukleárne leukocyty. Protilátky reagujú s antigénmi, ktoré sú prítomné v membráne cieľových buniek, alebo sú na ne naviazané. Následná aktivácia komplementového systému alebo tzv. „K-buniek“<sup>1</sup> spôsobia ich lýzu. Dochádza k poškodeniu tkaniva na základe uvoľnenia hydrolytických enzýmov z neutrofylov po ich autolýze.

Príkladom je hemolytická anémia.

---

<sup>1</sup> K-bunky (Killer Cells) – označenie buniek, ktoré sa zúčastňujú na bunkami sprostredkovanej cytotoxicite závislej od protilátky (tzv. ADCC-reakcii). Patria sem: neutrofil, eozinofil, makrofág a NK-bunky. BUC, M. 2012.

- ❖ **Reakcia III. typu:** K reakcii dochádza na základe vzniku antigén-protilátkových komplexov, ktoré sa v organizme ukladajú najčastejšie v bazálnych membránach glomerulov a pľúc. Za normálnych okolností dochádza k eliminácii týchto imunokomplexov retikuloendoteliálnym systémom. Problematické sú pomaly eliminovateľné imunokomplexy, ktoré v tkanivách tvoria depozity a následne dochádza k tvorbe zápalu. Príkladom typického imunokomplexového ochorenia je glomerulonefritída.
- ❖ **Reakcia IV. typu:** Od predchádzajúcich typov sa odlišuje tým, že rozhodujúcu úlohu majú bunky (najmä lymfocyty) a nie protilátky. T-lymfocyty vplyvom antigénu začnú produkovať cytokíny, ktoré vedú k zapojeniu ďalších buniek hlavne makrofágov a monocytov.

Typickým príkladom je tuberkulínová reakcia, kedy infiltráciou tkaniva týmito bunkami dochádza k indurácii<sup>2</sup> erytému a edému [4].

V roku 1989 bola spomenutá hygienická hypotéza, ktorá sa zakladala na tvrdení, že skoré vystavenie dieťaťa infekčným antigénom má protektívny vplyv v zmysle rozvoja alergických ochorení. Infekcie spôsobujú zvýšenú produkciu cytokínov IL-10 a TGF- $\beta$ , ktoré suprimujú tak Th1 ako aj Th2 odpoveď; IL-10 potlačuje Th17 imunitnú odpoveď [5,6]. U novorodencov po pôrode prevláda Th2 odpoveď, ktorá rozvoj alergie podporuje. Pokiaľ nemá dôjsť k imunitnej odpovedi imunitného systému matky na antigény plodu, Th1 odpoveď u matky je nutné potlačiť. Súčasná hygienická hypotéza hovorí o tom, že zníženie expozície bežným mikrobiálnym patogénom v skorom veku robí organizmus menej schopným indukovať T regulačné bunky (Regulatory T Cell; Treg) a tým sa zvyšuje riziko alergickej odpovede na bežné antigény. Opakovaná antibiotická liečba v skorom detstve vedie k zvýšenému riziku rozvoja astmy [5,6]<sup>3</sup>.

U alergikov hovoríme o hypersenzitívnej reakcii sprostredkovej Th2 lymfocytmi a ich cytokínmi, ktorá prevláda nad Th1 odpoveďou.

Na to, aby mohla alergická reakcia u človeka vzniknúť, musí najskôr dôjsť k senzitivizácii. Ide o komplexnú reakciu, v ktorej zohráva svoju úlohu alergén, prostredie a osoba vystavená alergénu. Alergén musí byť schopný vyvolať imunitnú reakciu u predisponovaných jedincov a následne vznik pamäťových buniek, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri opätovnom stretnutí s alergénom. Potencujúcim faktorom vzniku alergie sú faktory prostredia, ktoré oslabujú mechanickú bariéru epitelovej vrstvy (znečistené

<sup>2</sup> Indurácia – zatvrdnutie, stvrdnutie

<sup>3</sup> MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

ovzdušie, infekcia). Osoba vystavená alergénu musí mať pre vznik alergickej reakcie, genetickú predispozíciu [7].

Mediátory alergickej reakcie môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne podľa časovej následnosti akou sa uvoľňujú a pôsobia. Primárne sú prítomné v granulách bazofilov, mastocytov a eozinofilov, ktoré už sú prítomné v mieste zápalu a patria medzi ne histamín, proteázy, ECF (Eosinophil Chemotactic Factor – eozinofilný chemotaktický faktor), NCF (Neutrophil Chemotactic Factor – neutrofilný chemotaktický faktor) a heparín. Sekundárne sú syntetizované a uvoľňované až po aktivácii buniek a počas degranulácie. Patrí medzi ne PAF (Platelet-Activating Factor), leukotriény, prostaglandíny, bradykiníny a rozličné cytokíny a chemokíny<sup>4</sup>.

Alergickú reakciu môžeme rozdeliť na skorú a neskorú fázu, pričom skorá, ktorú popisujeme vyššie nastupuje do 20 minút. Neskorá reakcia (LPR; Late Phase Reaction), ako napríklad perzistujúci zápal a chronické symptómy alergií sú spôsobené neskorou bunkovou odpoveďou, za ktorú sú zodpovedné alergén-špecifické T-lymfocyty aktivované kontinuálnym vystavením alergénu. Táto fáza imunopatologickej reakcie začína približne po 6 – 12 hodinách v dôsledku migrácie T-lymfocytov na miesto zápalu pôsobením cytokínov [8]. Rozdiel mediátorov medzi týmito dvoma fázami alergickej reakcie je v chýbaní PGD2 a tryptázy v LPR, čo súčasne naznačuje, že histamín tejto fázy pochádza z bazofilov [9].

Alergén špecifické Th2 bunky pôsobia cez IL-4 a IL-13 a indukujú izotypový prešmyk na IgE a vedú ku klonálnej expanzii pamäťových B buniek [8]. Rozlišujeme dva typy Fc receptorov pre IgE. Prvý, FcεRI je exprimovaný na mastocytoch a bazofiloch, predstavuje vysokoafinitný receptor imunoglobulínovej superrodiny. Druhý receptor pre IgE, FcεRII, nazývaný aj ako CD23 viaže IgE s nízkou afinitou. Je prítomný prevažne na B bunkách, aktivovaných T<sub>H</sub> bunkách, monocytoch, eozinofiloch či folikulárných dendritických bunkách. Bol považovaný za rozhodujúci pre reguláciu hladiny IgE. Myšie modely, v ktorých gén pre CD23 bol inaktivovaný, stále vykazovali relatívne normálnu polyklonálnu, mediovanú IgE odpoveď [6,8]<sup>5</sup>.

---

<sup>4</sup> OWEN, J.A., *et al.* 2013.

<sup>5</sup> MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

## 1.2 Atopia

Atopia, čiže dedične podmienený sklon k tomu, aby sa stal človek alergikom. U jedincov, ktorí majú v rodine príbuzných trpiacich na atopickú alergiu, je pravdepodobnejší výskyt alergických reakcií než v rodinách kde sa alergia nevyskytuje. IgE odpoveď a alergický zápal sú mediované hlavne Th2 bunkami, ktoré sa účastia aj imunitnej odpovedi proti parazitom. Naproti tomu Th1 bunky indukujú apoptózu bronchiálneho epitelu a buniek hladkej svaloviny bronchov pri astme a pri atopickej dermatitíde aktivujú apoptózu keratinocytov. Regulácia imunitného systému zahŕňa už okrem spomínaných Th1 a Th2 buniek aj prozápalové Th9 či Th17 bunky [8].

V súvislosti s atopiou sa spomína aj termín „*atopic march*“. Tento termín popisuje postupný rozvoj ochorení súvisiacich s alergickým ochorením od atopickej dermatitídy cez alergickú rinitídu až po alergickú astmu. Nie vždy však dôjde až k rozvoju posledného štádia, teda astmy [10,11].

## 1.3 Anafylaxia

V súčasnosti je anafylaxia definovaná ako ťažká alergická reakcia po kontakte s alergénom, ktorá môže viesť ku smrti pacienta. Medzi typické príznaky rozvoja anafylaktickej reakcie patrí akútny vznik kožných a slizničných symptómov a respiračnému, prípadne kardiovaskulárnemu zlyhávaniu organizmu, pričom vysoká hladina TNF- $\alpha$  vedie ku systémovej anafylaktickej reakcii. Tieto príznaky sa môžu rozvinúť v jednom, alebo všetkých spomenutých systémoch v priebehu minút až hodín od kontaktu s látkou, na ktorú je dotyčná osoba alergická. Rozvoj príznakov a stupeň ich závažnosti taktiež závisí od veku postihnutej osoby a horšia prognóza je taktiež u ľudí s pľúcnymi ochoreniami. Anafylaxiu rozdeľujeme na IgE, IgG a imunokomplexami mediovanú, teda alergickú a nealergickú vyvolanú chladom, námahou, alebo liekmi. Podrobnosti o tomto rozdelení sú však nad rámec tejto práce, a preto ich v práci nepopisujem [8,12].

## 1.4 Slizničný imunitný systém

Slizničné povrchy a pokožka sprostredkovávajú každodenný kontakt medzi organizmom a vonkajším prostredím [13].

Slizničné povrchy (zažívací, respiračný, urogenitálny a ďalšie) sú zväčša pokryté jednovrstvovým epitelom, ktorý tvorí plochu približne 300 m<sup>2</sup>. Najväčší epitelový povrch (okolo 200 m<sup>2</sup>) pokrýva črevo [13]. Preto sú mukózne povrchy chránené komplexom mechanizmov, vďaka ktorým sa organizmus bráni pred rôznorodým agens. Jedným z nich je MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), vysoko špecializovaný imunitný systém zahrňujúci približne 80% imunologicky aktívnych buniek. Väčšina týchto buniek sa nachádza v tkanive GIT (Gastrointestinálneho traktu), kde býva najvyššia prevalencia imunogénnych stimulov z potravy a zložiek mikrobioty. Najhojnejšia mikrobiota sa nachádza v distálnych častiach čreva; väčšina črevných baktérií predstavuje Gram negatívne baktérie [13,14].

Základnou úlohou slizničného imunitného systému spočíva v ochrane proti vstupu patogénnych mikroorganizmov a ďalších zložiek do vnútorného prostredia organizmu (funkcia bariéry), ako aj schopnosť rozlišovať medzi prospešnými a nebezpečnými mikroorganizmami a zároveň nereagovať na neškodné potravinové alergény. Preto medzi ďalšie podstatné vlastnosti patrí indukcia tolerančných mechanizmov, kde veľmi dôležitú úlohu majú T regulačné lymfocyty, produkcia IL-10 a TGF- $\beta$ , preferenčná indukcia Th2 odpovedi, indukcia IgA a IgM protilátok a mnohé ďalšie mechanizmy, ktoré zabezpečujú udržanie homeostázy slizničnej imunity [15,16]. Napriek tomu môže byť slizničná rovnováha narušená útokom mikrobiálnych patogénov či ich toxínov, alebo nedostatočnou funkciou zložiek imunitného systému, ktoré môžu spôsobiť poruchy, ako sú infekčné, či zápalové ochorenia, alergie, zlyhanie mnohých orgánov, dokonca môžu prispievať k rozvoju niektorých autoimunitných ochorení (reumatoidná artritída, diabetes typu 1,...) [13,17].

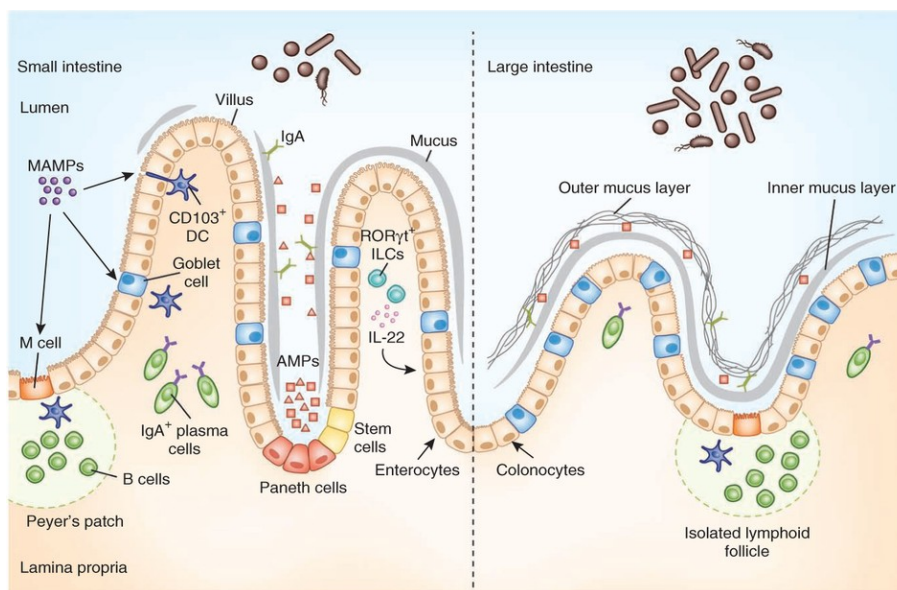
Expresia proteínov v čreve (occludin, claudin, JAM (Junctional Adhesion Molecules) a tricellulin) [18] je striktne regulovaná a závisí od črevného kompartmentu, lokalizácie kľkov a krýpt, špecifite bunkovej membrány a fosforylácie [19]. Zmenená expresia alebo lokalizácia proteínov tesných spojov (Tight Junction; TJ) a dysfunkcia črevnej bariéry je považovaná za kľúčovú pri predispozícii a exacerbácii<sup>6</sup> mnohých

---

<sup>6</sup> Exacerbácia – zhoršenie alebo nové, opätovné prepuknutie choroby

autoimunitných a zápalových stavov vrátane zápalových ochorení čriev (Inflammatory Bowel Disease; IBD), potravinovej alergie, celiakie a diabetu. Napríklad, cytokíny TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , hlavné mediátory črevných zápalových ochorení, podporujú reorganizáciu alebo rozrušenie niekoľkých tesných spojov ako sú ZO-1, JAM-A, occludin, claudin-1 a claudin-4 prostredníctvom deregulovanej expzie týchto proteínov [20,21]. Zatiaľ čo stimulácia epitelových buniek hrubého čreva pomocou cytokínov Th2 imunitnej odpovede (IL-4 alebo IL-13) indukuje zvýšenie črevnej permeability, ukázalo sa, že protizápalový cytokín IL-10 má ochrannú funkciu v črevnej bariére (Obr. 1) [22].

Niektoré enterické patogény (ako sú *Vibrio cholerae*, enteropatogénne *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* a iné) vyvinuli mechanizmy rozrušujúce TJ epiteliálnych buniek na prekonanie epiteliálnej bariéry alebo pre získanie živín. Môžu sa viazať priamo na molekuly bunkových povrchov a indukovať zmeny v expresii proteínov TJ alebo vytvárať toxíny a proteázy, ktoré môžu podporovať bunkové poškodenie a apoptózu, meniť transport iónov a narušiť TJ a tým aj ich cytoskelet [23]. Na rozdiel od enterických patogénov, niektoré komenzálne a probiotické baktérie posilňujú funkciu bariéry a chránia ju pred narušením patogénmi [24]. Štúdie skúmajúce účinky probiotík na proteínoch TJ ukázali, že živé *Streptococcus thermophilus* (ATCC19258) a *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356) menia fosforyláciu niekoľkých príbuzných proteínov TJ [25], zatiaľ čo živá *Escherichia coli* Nissle 1917 preukázala zvýšenú produkciu ZO-2 [26]. Zvýšenie integrity epiteliálnej bariéry kmeňmi laktobacilov alebo bifidobaktérií bolo pozorované v modeloch *in vitro* a *in vivo* [27–29] ako aj v biopsii zdravých ľudí [30].



Obr. 1: **Imunitné mechanizmy slizničnej steny, ktoré obmedzujú kontakt medzi črevnou mikrobiotou a bunkovým povrchom epitelu.** Črevný epitel obsahuje jednu vrstvu enterocytov alebo kolonocytov a úlohou imunitného systému je chrániť integritu tejto bariéry. Pohárikovité bunky (Goblet cells) vylučujú mucinové glykoproteíny, ktoré sa zhromažďujú vo vnútornej a vonkajšej vrstve mukózy. Panethove a pohárikovité bunky sekretujú antimikrobiálne proteíny, ktoré pomáhajú eliminovať baktérie prenikajúce do mukóznej vrstvy. Plazmatické bunky produkujú IgA, ktorý je transcytovaný cez epitelovú vrstvu a obmedzuje počet baktérií spojených so sliznicou. Existujú určité rozdiely v bariére v tenkom a hrubom čreve (Prevzaté a upravené podľa Browna, *et al.*) [31].

MAMP's – microbe-associated molecular pattern; M cell – Microfold cells; AMP's – Antimicrobial peptides; ILC's – Innate Lymphoid Cells

## 1.5 Mikrobiota

Vývoj mikrobiálneho systému (ďalej zvanom ako mikrobiota) a kože u novorodenca je postupný a závisí od viacerých faktorov. Ľudia majú rozmanitý systém pozostávajúci z množstva vírusov, baktérií, ktorý predstavuje približne 1-3% telesnej hmotnosti. Mikroorganizmy kolonizujú všetky povrchy tela, ktoré sú vystavené životnému prostrediu. Samozrejme, odlišné mikrobiálne druhy sa nachádzajú na koži, v pošve, respiračnom trakte a pozdĺž celého gastrointestinálneho traktu (GIT-u) – od úst po konečník.

Mikrobiota u zdravých jedincov je vo všeobecnosti stála v priebehu času. Jej zloženie môže byť ovplyvnené rôznymi faktormi, ako sú zmena stravy, urbanizácia, cestovanie a najmä používanie širokospektrálnych antibiotík. Jednotlivé taxóny sa líšia medzi jednotlivcami. Netreba zanedbávať fakt, že črevná mikrobiota sa podieľa na mnohých chemických procesoch, ktorých odpadové látky môžu byť zdrojom zápalu, alebo rozvoja nádoru. Zároveň môže zloženie našej črevnej mikrobioty ovplyvňovať aj telesnú hmotnosť [32,33].

Črevná mikrobiota sa u človeka začína vyvíjať hneď po pôrode, kedy je GIT novorodenca prakticky sterilný, ďalej prechádza veľkými zmenami pri prechode na pevnú stravu a odstavení a na mikrobiotu dospelého človeka sa začína podobať približne v dvoch rokoch <sup>7</sup>.

Črevná mikrobiota je komplexný ekosystém dôležitý pre hostiteľa. Väčšina baktérií, ktoré kolonizujú črevný systém sú striktne anaeróbne a nad aeróbnymi a fakultatívne anaeróbnymi baktériami prevládajú v pomere 1000:1. Vývoj tohto vnútorného ekosystému u novorodenca prebieha postupne a závisí od vonkajších a vnútorných faktorov. Počas pôrodu a po ňom prichádza dieťa do styku hlavne s baktériami vo vaginálnom a perianálnom prostredí matky. Ako prvé osídľujú GIT u dojčených detí aeróbne baktérie pričom u nedojčených býva nižší počet bifidobaktérií a u detí porodených cisárskym rezom prevládajú fakultatívne anaeróbne baktérie. Ďalším exogénnym faktorom je úroveň hygieny a podávanie antibiotík novorodencom a samozrejme aj geografické rozdiely medzi jednotlivými krajinami. Špecifická bakteriálna mikrobiota detského intestinálneho traktu ovplyvňuje rozvoj slizničnej a systémovej imunity dieťaťa. Rovnako významnú úlohu hrá kolonizácia baktériami aj v rozvoji alergických ochorení. V postnatálnom období prevláda podpora buniek Th1 imunitnej odpovede, TGF-β potlačuje bunky Th2 odpovede typické pre fetálne (plodové) obdobie a dochádza k indukcii orálnej tolerancie. Veľmi pomaly stúpa aj produkcia sekrečného IgA (sIgA) ako základného imunoglobulínu slizničnej imunity. Existuje možnosť v pozitívnom zmysle ovplyvňovať rozvoj a priebeh alergií pomocou probiotických bakteriálnych kmeňov ako napríklad *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83). Pri perorálnom podaní probiotickej vakcíny s obsahom *E. coli* O83 krátko po narodení, ostala dôležitou zložkou mikrobioty dieťaťa po dobu niekoľkých mesiacov. Podľa výsledkov štúdií daný kmeň *E. coli* O83 poskytuje dlhodobú ochranu pred vznikom alergických ochorení [34].

## 1.6 Probiotiká a ich charakteristika

*„Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré pri podaní v dostatočnom množstve vyvolávajú zlepšenie zdravotného stavu hostiteľa.“* <sup>8</sup>

Probiotiká sú nepatogénne mikroorganizmy, ktoré po užití kolonizujú črevo, zlepšujú jeho mikrobiálnu rovnováhu a pôsobia prospešne na zdravie a fyziologické

---

<sup>7</sup> FRÜHAUF, P. 2011.

<sup>8</sup> Definícia probiotík podľa WHO (Svetová Zdravotnícka Organizácia)



pochody hostiteľa. Prvé probiotikum (*Lactobacillus bulgaricus*) izoloval roku 1905 ruský mikrobiológ Il'ja Mečnikov. Termín – probiotika – zaviedli ako prvý Lilly a Stillwell v roku 1965 v článku uverejnenom v časopise *Science* [35]. V dnešnom zmysle ho použil v roku 1974 Parker, ktorý probiotiká charakterizoval ako organizmy a substancie prispievajúce k mikrobiálnej rovnováhe v črevách<sup>9</sup>.

Probiotické organizmy sú obsiahnuté prevažne v mliečnych produktoch avšak nájdeme ich aj v produktoch nemliečnych (napr. kyslá kapusta, fermentované obilniny a iné potraviny na rastlinnom podklade), ktoré obsahujú živé probiotické mikroorganizmy – napríklad *Escherichia coli* [36].

### 1.6.1 Prebiotiká

Jedná sa o látky, ktoré sú nerozložiteľné enzymatickým systémom eukaryotických buniek a sú zdrojom energie a substrátov pre prokariotické probiotické baktérie. Z veľkej časti sa jedná o oligosacharidy, xylany, pektíny a celulózu. Produkty vzniknuté pôsobením bakteriálnych enzymatických systémov môžu okrem výživy pre probiotickú mikrobiotu slúžiť aj ako zdroj energie a antioxidantov pre sliznicu čreva [37,38].

### 1.6.2 Probiotická vakcína „*Colinfant Newborn*“

Bakteriálna kolonizácia čreva alebo perorálne podávanie usmrtených baktérií bola testovaná ako prevencia proti enterickým infekciám a ako stimulácia lokálneho imunitného systému u zvierat, dospelých a tiež dojčiat [39]. Antigénna štruktúra kmeňa *E. coli* O83 bola popísaná roku 1978 Medzinárodným centrom *Escherichia* a *Klebsiella* v Kodani ako O83:K:H31 a o niečo neskôr bol antigén K identifikovaný ako K24 [241]. Kmeň *E. coli* O83:K24:H31 sa u človeka vyskytuje veľmi zriedkavo, je citlivý na väčšinu antibiotík a neobsahuje plazmidy [39,40].

Probiotická vakcína pod názvom „*Colinfant Newborn*“ obsahuje lyofilizovanú suspenziu živých buniek *E. coli* O83<sup>10</sup>. Kolonizácia komenzálnym kmeňom *E. coli* O83 sa ukázala ako bezpečná a účinná v prevencii a liečbe nozokomiálnych infekcií novorodencov a kojencov do 1 roku a pre nedonosené deti, zvlášť nekojené, u ktorých ešte nedošlo k úplnému vývinu imunitného systému a vyváženej črevnej mikrobioty [41]. Používa sa

---

<sup>9</sup> TOURNUT, J. 1989.

<sup>10</sup> HÁJKOVÁ, A. 2013.

predovšetkým k prevencii nemocničných nákaz, žalúdočných a črevných ochorení rôzneho pôvodu, poruchách zloženia črevnej mikrobioty. Veľmi dobre osídľuje črevný trakt a jeho dlhodobá prítomnosť v čreve stimuluje tvorbu špecifických a nešpecifických protilátok [40].

V starších sledovaných štúdiách bolo preukázané že hladina IgA u detí alergických matiek, ktorým bola podávaná probiotická vakcína *E. coli* O83 je oveľa vyššia než u kontrolných skupín detí alergických matiek bez podanej probiotickej vakcíny a je porovnateľná prípadne aj vyššia ako u detí nealergických matiek. Rovnako sledovaným parametrom bola i hodnota zápalových interleukínov, ktorá bola zvýšená v skupine detí alergických matiek bez podanej probiotickej vakcíny [42]. Neskoršie osídľovanie čriev probiotickou vakcínou spôsobuje zníženú stimuláciu polysacharidmi a teda spomalenie zrenia imunitného systému<sup>11</sup>.

Diplomová práca vychádza z už začatých štúdií, avšak jedná sa len o objasnenie mechanizmu účinku *E. coli* O83. V tejto práci išlo o pridávanie probiotického kmeňa *E. coli* O83 ku získaným dendritickým bunkám z pupočníkovej krvi a následne ich kultivácii *in vitro*. Výsledkami a metódami týchto pokusov sa podrobnejšie zaoberá štvrtá a šiesta kapitola.

---

<sup>11</sup> ŽÁDNIKOVÁ, R. *et al.* 2006.

## 2 DENDRITICKÉ BUNKY

### 2.1 Objavenie dendritických buniek

Pri objavení dendritických buniek (DC) v roku 1973 Steinman a Cohn študovali bunky sleziny pre pochopenie indukcie imunitnej odpovedi na lymfoidných orgánoch myši. Pretože bunky mali nezvyčajný tvar, jednalo sa o stromovitý tvar či bunky s dlhými výbežkami (dendrity), pomenovali ich ako „*dendritické bunky*“.

Na rozdiel od makrofágov boli DC oddelené od povrchov, mali horšiu životaschopnosť a ich obrat v slezine bol rýchly. Takisto mali málo tráviacich enzýmov alebo lyzozómov a aj slabšiu fagocytárnu aktivitu *in vivo* či *in vitro*. Preto Cohn a Steinman identifikovali populáciu dendritických buniek ako novú populáciu, ktorá má odlišné vlastnosti a funkcie [2,43–45].

V roku 1979 Steinman prišiel na spôsob ako túto malú populáciu buniek získavať, roku 1992 prišiel na to, ako ich generovať z progenitorov, monocytov. DC boli postupne nachádzané v mnohých orgánoch a živočíšnych druhoch a to aj v ľudskej krvi. Boli identifikované podtriedy DC, z ktorých každá má svoje vlastné povrchové znaky. DC sa pozorovali v oblasti orgánov lymfatického systému, čo je ideálne miesto pre iniciáciu imunity [44–46].

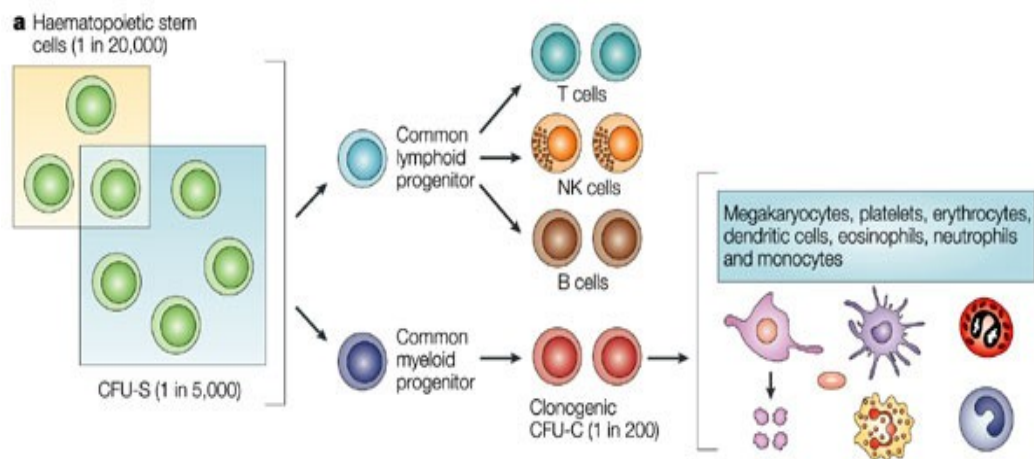
### 2.2 Vývoj dendritických buniek

Bunky imunitného systému sú v tele jedinca neustále obnovované. Väčšina buniek, ktoré sú zapojené do imunitných odpovedí vzniká z nediferencovaných hematopoetických kmeňových buniek (Hematopoietic Stem Cells; HSC). Pluripotentná kmeňová bunka (CD34<sup>+</sup>) je schopná seba obnovovania a pod vplyvom faktorov mikroprostredia, ako sú cytokíny a medzibunkové interakcie sa môže diferencovať do dvoch hlavných vývojových línií, a to lymfoidnej a myeloidnej (Obr. 2, Obr. 3). Z lymfoidnej vývojovej línie vznikajú T bunky, B bunky a NK bunky; myeloidná línia dáva vznik erytrocytom, megakaryocytom, monocytom a granulocytom. Imunitné bunky jednotlivých vývojových línií sú adaptované na vykonávanie špecializovaných funkcií pri imunitných reakciách. Bunky myeloidnej línie zabezpečujú predovšetkým nešpecifické obranné mechanizmy

(zápal, fagocytóza, homeostáza), naopak bunky lymfoidného pôvodu sú kľúčové pri odpovedi špecifickej imunity (produkcia protilátok, cytotoxicita)<sup>12</sup>.

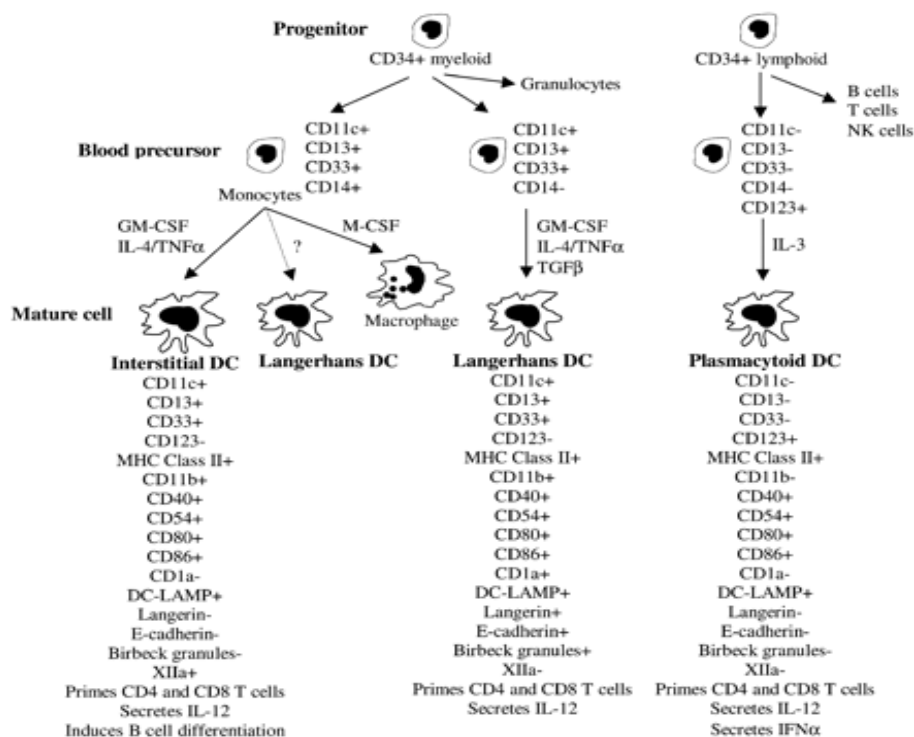
Hlavný význam DC spočíva v tom, že pohlcujú a spracovávajú endogénne aj exogénne antigény, vystavujú ich na svojom povrchu v komplexe MHC-antigén. Keď rozoznajú a vystavia na svojom povrchu potenciálne nebezpečný antigén, prestanú fagocytovať, zvyšujú expresiu kostimulačných molekúl a migrujú pod vplyvom ďalších chemických ligandov ako sú CCL19 či CCL21 do sekundárnych lymfatických tkanív, ako je slezina a lymfatické uzliny, kde interagujú a stimulujú T bunky, ktoré svojim špecifickým TCR rozoznávajú komplex MHC-antigén na povrchu DC a tým indukujú imunitnú odpoveď. DC umierajú pokiaľ nedostanú signál z aktivovaných T buniek cez interakciu CD40-CD40L [47].

Flt3L (Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand) bol u ľudí využívaný k diferenciácii kmeňových buniek a progenitorov DC *in vivo*. *In vitro* je možné DC získať z krvných prekursorov za použitia rôznych rastových faktorov, ako sú GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), CSF (Colony Stimulating Factor), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), IL-4, IL-3 a ďalšie [48].



Obr. 2: Vývoj hematopoetickej kmeňovej bunky do dvoch línií – lymfoidnej a myeloidnej. (Prevzaté od Sorrentina) [49]. CFU (Colony Forming Unit) – označenie nezrelej krvnej kmeňovej bunky v kostnej dreni, ktorá je už predurčená k vývoju určitého typu

<sup>12</sup> BUREŠ, J. *et al.*, 2015.



Obr. 3: Schematické znázornenie vývoja ľudských dendritických buniek z CD34<sup>+</sup> myeloidných a lymfoidných progenitorov. U ľudí, DC sú prítomné ako prekursori v kostnej dreni a v krvi a ako zrelšie formy v lymfatických a nelymfatických tkanivách (Prevzaté od Lipscomba a Mastena) [48].  
DC-LAMP – monoklonálna protilátka CD208

### 2.3 Úloha DC v imunitnom systéme

Imunitný systém predstavuje súbor buniek a orgánov, ktorých hlavnou úlohou je obrana organizmu proti infekcii. Tento systém sa vyskytuje už u najjednoduchších mnohobunkových organizmov v primitívnej forme. Čo sa týka stavovcov, hovoríme o veľmi zložitom komplexe tvorenom dvoma základnými zložkami, systémom antigénne nešpecifickej (vrodenej, prirodzenej) a špecifickej (adaptívnej) imunity [50].

Zložky nešpecifickej imunity sú evolučne staršou časťou imunitného systému, ktoré sú schopné reagovať na prítomnosť patogénov v organizme. Sú aktivované signálom nebezpečia, čo následne vedie k spusteniu efektorových mechanizmov a eliminácii patogénnych organizmov [51]. Význam antigénne nešpecifickej imunity je podložený štúdiou vrodených defektov imunity ako u myši tak aj u ľudí [52–54]. Takýto organizmus je náchyľnejší na infekciu a to aj vtedy, keď sú zložky antigénne špecifickej, adaptívnej imunity v poriadku [55].

Základ adaptívnej imunity spočíva v existencii obrovského množstva receptorov s presne danou antigénnou špecifitou, čo poukazuje na fakt, že takmer pre každý antigén v organizme existuje špecifický lymfocyt [55]. Frekvencia lymfocytov, ktoré sú špecifické pre konkrétny antigén sa pohybuje okolo 1-2 na 100 000 lymfocytov. Z toho vyplýva, že takýto malý počet lymfocytov nie je schopný eliminovať patogény a z toho dôvodu dochádza po rozpoznaní antigénu najprv ku klonálnej expanzii a vytvoreniu dostatočne veľkej populácie efektorových buniek. Tento proces trvá približne 4 – 7 dní, pričom obranu organizmu v tomto období zaisťuje nešpecifická imunita. Rozpoznanie antigénu a zahájenie klonálnej expanzie predstavuje zložitý proces, ktorého sa zúčastňujú mnohé ďalšie bunky imunitného systému – tým sa znižuje riziko chybných aktivácií lymfocytov bez vzniku autoagresívnych reakcií (autoimunitné reakcie a alergie). Pre účinnú aktiváciu musí byť antigén lymfocytom prezentovaný prostredníctvom APC a zároveň musí lymfocyt od týchto buniek obdržať kostimulačný signál. Komplexy peptid-MHC (p/MHC) sú rozpoznávané pomocou T bunkového receptora (TCR); ďalšie signály poskytujúce impulz pre diferenciáciu a kostimuláciu lymfocytov sú kostimulačné molekuly a cytokíny. Medzi APC zaraďujeme dendritické bunky, Langerhansove bunky<sup>13</sup>, makrofágy, B lymfocyty a epiteliálne bunky, u ktorých je expresia MHC molekúl II. triedy indukovaná až po ich aktivácii.

DC majú medzi APC významné postavenie a to tým, že sú schopné stimulovať naivné T-lymfocyty a tým zahájiť primárnu imunitnú odpoveď [56–58].

Potom, čo DC rozpoznajú signál nebezpečia, prechádzajú procesom maturácie, kde sa výrazne zvýši expresia MHC molekúl, kostimulačných molekúl CD80 a CD86, chemokínových receptorov pre chemokíny smerujúce bunky do sekundárnych lymfatických orgánov a produkcia cytokínov [59]. Zrelé DC migrujú do sekundárnych lymfoidných orgánov, kde dochádza k interakciám T-lymfocytmi [60]. Interakcia MHC molekúl nesúcich antigén a T bunkový receptor (T-cell Receptor; TCR) predstavuje prvý signál, ktorý lymfocyt obdrží. Druhý signál spočíva v interakcii kostimulačných molekúl CD80 a CD86 s ich partnermi na povrchu lymfocytov, CD28. Prostredníctvom cytokínov, ktoré maturovaná DC produkuje, obdrží lymfocyt tretí signál. Cytokínové prostredie ovplyvňuje rovnako aj polarizáciu T bunkovej odpovedi [61–64]. Pre polarizáciu do Th1 je dôležitý predovšetkým cytokín IL-12 [65], v polarizácii Th2 má dôležitú úlohu IL-4

---

<sup>13</sup> Langerhansova bunka je dendritická bunka nachádzajúca sa v pokožke.

a neprítomnosť IL-12 [66]. Populáciu Th17 lymfocytov charakterizuje prítomnosť IL-6 spolu s TGF- $\beta$ . Vznik Treg sa indukuje prostredníctvom TGF- $\beta$  spolu s IL-10 [67–69].

### 2.3.1 Pohlcovanie a spracovanie antigénu

Úlohou DC je prenášať organizmu informácie o stave vnútorného prostredia prostredníctvom pohlčovania, spracovania a prezentácie antigénu. Pohlcovanie antigénu sa deje niekoľkými procesmi, a to receptormi sprostredkovanou endocytózou, fagocytózou alebo makropinocytózou.

Na endocytóze sprostredkovej receptormi, u ktorých sa pre pohltý materiál vytvára klathrínový váčok, sa podieľajú Fc receptory (CD32, CD64) [70], C-lektínové receptory (manosový receptor, DC-SIGN, langerin) [71], a scavengerové receptory [72,73].

Fagocytóza umožňuje DC pohlcovať pevné častice, nekrotické alebo apoptotické bunky a to za účasti integrínov, komplementových receptorov alebo scavengerových receptorov. Medzi novšie objavené receptory zúčastňujúce sa pri fagocytóze apoptických buniek, sú receptory skupiny TIM (v DC TIM-4) a receptory TAM (TYRO1, AXL, MER). Interakcia TIM-4 a TIM-1 na povrchu T-lymfocytov prispieva k aktivácii T-lymfocytov a ich ďalšiemu prežívaniu [74,75].

Makropinocytóza predstavuje mechanizmus, ktorým DC neselektívne skúma svoje okolie. Týmto je bunka schopná behom hodiny vymeniť až 40% svojho objemu. Tento proces prebieha v DC nepretržite a samovoľne [76].

Exogénne antigény sú po pohltení degradované pomocou lysozomálnych enzýmov na peptidy, ktoré sa vzápätí viažu na MHC-II. triedy. Endogénne antigény sú degradované v proteazóme pomocou proteáz, transportované pomocou TAP transportérov (Transporter Associated With Antigen Processing; TAP) (TAP1 a TAP2) do endoplazmatického retikula (ER) kde sa viažu na MHC-I. triedy [77]. V niektorých prípadoch dochádza k tomu, že sa exogénny peptid alebo proteín z fagozómu dostáva do cytosólu<sup>14</sup>, kde sa spracováva podobne ako endogénne molekuly → je štiepený proteazómom. Vzniknuté fragmenty sú následne prenesené prostredníctvom TAP transportérov do ER a naviazané na MHC molekuly I. triedy. Tento proces sa nazýva „cross-presentation“, čo je veľmi dôležitá vlastnosť DC uplatňujúca sa najmä pri vírusových ochoreniach či pri boji proti nádorom. Na vzniku komplexu p/MHC sa podieľajú ďalšie proteíny tvoriace tzv. PLC

---

<sup>14</sup> Cytosól = základná plazma = matrix: označuje gélové vnútorné prostredie bunky.

(Peptide-Loading Complex), medzi ktoré zaradujeme calreticulin, calnexin, tapasin a ERp57. Iba v prípade naviazania peptidu na molekulu MHC putuje celý komplex na povrch bunky [78,79].

Druhá cesta nezávisí od TAP transportérov a k väzbe antigénu na molekulu MHC dochádza v endozóme. Endocytovaný antigén je transportovaný do špecializovaných včasných endozómov, zvaných ako MIIC kompartmenty (MHC-II. Rich Compartments). Optimálne štiepenie proteínu zaisťujú proteázy prítomné v endozóme; najmä cysteínové (katepsíny B, L a H) a aspartátové (katepsíny D a E) [79,80].

Antigény prezentované na MHC-I. triedy sú rozpoznávané TCR na povrchu cytotoxických CD8 lymfocytov, naopak antigény prezentované na MHC-II. triedy interagujú prostredníctvom TCR na povrchu pomocných CD4 lymfocytov [78,80].

Bolo dokázané, že krátko po aktivácii DC maturačným signálom dochádza k výraznému zníženiu makropinocytárnej aktivity bunky. Dochádza k remodelácii aktínu v podozómoch<sup>15</sup>, čo bunke umožní krátkodobo zvýšiť kapacitu endocytózy [76]. Týmto zvýšením bunka pohltí veľké množstvo materiálu, ktorý bol v blízkosti bunky, keď došlo k stimulácii DC. Tým sa zvyšuje pravdepodobnosť, že DC pohltí časť patogéna, ktorý jej aktiváciu vyvolal [81,82]. Vystavenie časti patogéna, vyvolávajúceho maturáciu je zabezpečené i v prípade, keď sú pohltené častice neobsahujúce aj obsahujúce TLR (Toll-Like Receptor) ligand. Komplex p/MHC sa vytvára len v tých endozómoch, v ktorých bol TLR ligand prítomný [83].

V priebehu maturácie dochádza tak isto k zmenám v spracovávaní a prezentácii antigénu. Expresia molekúl MHC-I. a MHC-II. triedy sa na povrchu DC zvyšuje až sto násobne [76,84]. V prípade MHC-I. triedy je tento nárast spôsobený zvýšením syntézy týchto molekúl [79]; ďalej zvýšenou expresiou aktivátoru proteasomu PA28, čo spôsobí vzostup počtu peptidov produkovaných proteazómom. Rovnako stúpa aj expresia TAP transportérov [78,85]. V priebehu maturácie DC sa niekoľkonásobne predlžuje doba, počas ktorej je MHC-I. triedy exprimovaná na bunkovom povrchu [86].

V prípade MHC-II. triedy sa pôvodne predpokladalo, že zvýšená povrchvá expresia je rovnako výsledkom zvýšenej transkripcie MHC génov, lenže výsledky z expresného profilovania však ukázali, že k zvýšeniu transkripcie týchto génov nedochádza [86,87]. Pravdepodobne sa jedná o ochranný mechanizmus, aby pri zvýšenej syntéze *de novo* nenastalo rýchle nahradenie MHC s pohlteným a spracovaným peptidom novými

---

<sup>15</sup> Podozómy – alternatívne formy adhézie typické hlavne pre nádorové bunky



molekulami MHC, ktorý by samozrejme niesli iný antigén [88,89]. Zvýšená povrchová expresia u MHC-II. triedy je výsledkom niekoľkých javov. Po maturácii DC sa v lyzozómoch aktivuje vakuolárna protónová pumpa, čím sa zníži pH v lyzómoch a podporí štiepenie proteínov a peptidov na fragmenty, ktoré budú viazané na MHC [81]. Významnejšie je však predĺženie doby expozície molekúl MHC-II. triedy na povrchu bunky. U nezrelých DC sú MHC II. triedy rýchlo internalizované, zatiaľ čo na povrchu maturovaných DC zostávajú v stabilnej forme aj niekoľko dní [90]. Predĺženie času, počas ktorého sa p/MHC exprimuje na povrchu DC, je výsledkom potlačenej endocytózy týchto komplexov v maturovaných DC. Endocytóza MHC komplexov sa riadi pomocou ubiquitinylácie. Keď sa na  $\beta$  reťazci MHC komplexu nachádza molekula ubiquitínu, je určená k endocytóze a degradácii. Za proces ubiquitinylácie zodpovedá MARCH-1 ligáza, ktorej aktivita sa v priebehu maturácie znižuje, čo vedie k zníženej endocytóze MHC komplexu a tým k predĺženiu doby exprese molekúl MHC-II. triedy na povrchu DC [91–93]. Ďalším mechanizmom vedúcim k zvýšenej expresii bolo považované zadržovanie novo syntetizovaných MHC molekúl v endozómoch. Predpokladalo sa, že potom čo bunka obdrží maturačný signál, dôjde k väzbe peptidu na nahromadené molekuly MHC a následne k uvoľneniu komplexov p/MHC z endozomálneho kompartmentu a ich vystaveniu na povrchu bunky [94]. O niečo neskôr ďalšie výskumy túto teóriu vyvrátili a tvrdia, že najväčšia dôležitosť je prikladaná predĺženej expresii MHC molekulám II. triedy na povrchu DC [79,95].

### 2.3.2 Morfológia dendritických buniek

Počas maturácie dochádza v DC k reorganizácii aktínovej časti cytoskeletárneho aparátu, čím DC získavajú charakteristický tvar s výbežkami – dendrity. Tento ich typický tvar zabezpečuje lepšiu pohyblivosť a schopnosť migrácie, zároveň zväčšuje plochu, ktorá môže byť využitá pre styk DC s T-lymfocytom. Kontrolným článkom v remodelácii pôsobí fascín<sup>16</sup> [96,97]. V promotórovej oblasti fascínu boli identifikované regulačné miesta, na ktoré sa môžu viazať transkripčné faktory zahrnuté v signalizačných kaskádach niektorých PRR (Pattern-Recognition Receptors) [98]. Ďalším proteínom,

---

<sup>16</sup> Fascín – proteín viažúci aktín, ktorá sa nachádza prevažne v mezenchymálnom tkanive, nervovom systéme a tkanivách sietnice; zvyšuje motilitu buniek v rôznych transformovaných bunkách.

ktorého expresia sa výrazne zvyšuje po maturácii DC a podieľa sa na organizácii aktínu, je cofilín, ktorý podporuje disociáciu aktínových monomérov z aktínového vlákna [99,100].

### **2.3.3 Migrácia dendritických buniek**

Väčšina DC cirkuluje v tele v „nezrelom“ stave, v ktorom nedokážu indukovať imunitnú odpoveď. Nezrelé bunky sú však schopné intenzívnej fagocytózy. DC sa nachádzajú najmä na miestach, ktoré predstavujú najväčšie riziko pre vstup mikroorganizmov do tela. Takisto sú umiestnené v rôznych lymfatických cievach, ktoré umožňujú presun buniek z periférnych tkanív do lymfatických orgánov. Tam dochádza ku stretnutiu s lymfocytmi, ktoré sú prezentované na povrchu DC. V tomto bode sa spustí imunitná odpoveď. Lymfocyty začnú proliferovať a produkovať produkty, ktoré budú slúžiť na odstránenie infekcie a iné zdroje antigénov [101,102].

### **2.3.4 Expresia molekúl**

DC po maturácii exprimujú veľké množstvo kostimulačných molekúl CD80 (B7.1) a CD86 (B7.2). Tieto dve molekuly sú nesmierne dôležité v indukcii imunitnej odpovedi. Ich väzbovými partnermi sú molekuly na povrchu T-lymfocytov aktivačný CD28 a inhibičný CTLA-4 [103]. Boli popísané aj ďalšie molekuly z rodiny B7 molekúl a to B7-H1 (PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), CD274) , B7-DC (PD-L2, CD273) a B7-H2 (ICOSLG, GL50, B7RP1, CD275, ICOSL, LICOS); ich ligandom je PD-1 na povrchu T-lymfocytov. PD-L1 sa exprimuje na nezrelých DC a jeho expresia sa po aktivácii zvyšuje, zatiaľ čo PD-L2 na povrchu nezrelých DC prítomný nie je a k jeho expresii dochádza až po aktivácii DC [104,105]. Na rozdiel od CD80/CD86 a PDL sa expresia ďalšej molekuly z rodiny B7, ICOSL v interakcii s lymfocytmi v priebehu maturácie DC nemení [105]. Okrem kostimulačných molekúl z rodiny B7 sa na povrchu DC vyskytuje kostimulačná molekula CD40. Jej expresia narastá pri aktivácii DC a má dôležitú úlohu pri interakcii s T-lymfocytmi. Prostredníctvom CD40 DC obdrží signál ku stimulácii cytotoxických T-lymfocytov (CTL) [106].

V priebehu maturácie DC dochádza k expresii molekuly CD83, ktorej úloha spočíva v regulácii T- aj B-lymfocytárnej odpovedi [107]. Špecifická expresia tejto molekuly v maturovaných DC poukazuje na vhodný znak pre identifikáciu populácie DC [108,109].

Maturované DC exprimujú omnoho viac adhezívnych molekúl podieľajúcich sa na vytvorení synapsie medzi APC (DC) a T-lymfocytom. Jedná sa o LFA-1 (CD11a) (Lymphocyte-Function-Associated Antigen, LFA), ICAM-1 (CD54) (Intercellular Adhesion Molecule; ICAM), LFA-3 (CD58); na interakcii s T-lymfocytmi sa podieľajú LFA-2 (CD2), ICAM-2 (CD50), ICAM-3 (CD102) a  $\alpha/\beta$  integríny, ktorých expresia sa v priebehu maturácie výrazne nemení. (Obr. 4) [108].

### 2.3.5 Produkcia cytokínov

Zrelé DC produkujú rôzne cytokíny ovplyvňujúce charakter a rozvoj imunitnej odpovedi. Jedná sa o prozápalové cytokíny IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, ktoré fungujú ako lokálne aj systémové mediátory zápalu [110]. Ďalšiu veľkú skupinu tvoria imunoregulačné cytokíny (IL-10, IL-35, TGF- $\beta$ ) [111], ktoré ovplyvňujú niektoré komponenty imunitného systému a podieľajú sa tak na modulácii imunitnej odpovede. IL-12, IFN- $\gamma$  polarizujú imunitnú odpoveď smerom k Th1 [112]. Vývoj Th2 subpopulácie je determinovaný IL-4 [113], IL-23 v spojitosti s TGF- $\beta$  a IL-6 podporuje vývoj prozápalovej Th17 subpopulácie lymfocytov [114]. IL-10 indukuje vznik Tr1 (regulačných) lymfocytov [115]. Aktivitu NK buniek podporujú IL-12, IL-15, IL-18 a IFN- $\alpha$  [116]. IL-6, ako pleiotropný cytokín, ktorého úlohou je napomáhať diferenciácii B-lymfocytov, pôsobí ako prozápalový faktor indukujúci produkciu proteínov akútnej fázy v pečeni [117]. Ukazuje sa, že IL-6 dokáže zvrátiť imunosupresívne pôsobenie FoxP3<sup>+</sup> T regulačných lymfocytov (Treg) [118]. Maturované DC produkujú ešte aj IL-2, čím priamo ovplyvňujú klonálnu expanziu lymfocytov [119].

DC, u ktorých došlo k stimulácii prozápalovými faktormi, exprimujú veľké množstvo molekúl MHC-II. triedy, kostimulačných molekúl a prozápalových cytokínov, IL-12 však schopné produkovať nie sú. Dokonca aj jednotlivé TLR ligandy sa môžu odlišovať tým, akú výraznú produkciu IL-12 vyvolajú a či vôbec [120]. Rozpoznanie niektorých patogénov, ako sú baktérie rodu *Klebsiela*, *Citrobacter* a kvasinky rodu *Candida* nepovedie k produkcii IL-12 ale dôjde k produkcii cytokínov potrebných pre polarizáciu Th17 odpovede [120]. Faktorom pre úspešné zahájenie imunitnej reakcie je stretnutie DC s patogénom. Aktivácia DC prozápalovými cytokínmi môže adaptívnu imunitnú reakciu následne len amplifikovať [120].

Výsledkom interakcie medzi DC a T-lymfocytom môže byť indukcia tolerance alebo samotná imunitná reakcia. DC bývajú z tohto dôvodu rozdeľované na tolerogénne

nezrelé DC a imunogénne zrelé DC. Ďalšími pokusmi bolo ukázané, že tolerancia býva navodená čiastočne maturovanými alebo polo-maturovanými DC, zatiaľ čo navodenie imunitnej reakcie spôsobujú výlučne zrelé DC. DC môžeme teda rozdeliť na tri typy podľa následnej imunitnej odpovede a to na nezrelé, polozrelé a zrelé DC. Tolerogénne DC môžeme pripraviť aj *in vitro* pomocou kortikoidov a vitamínu D [121,122].

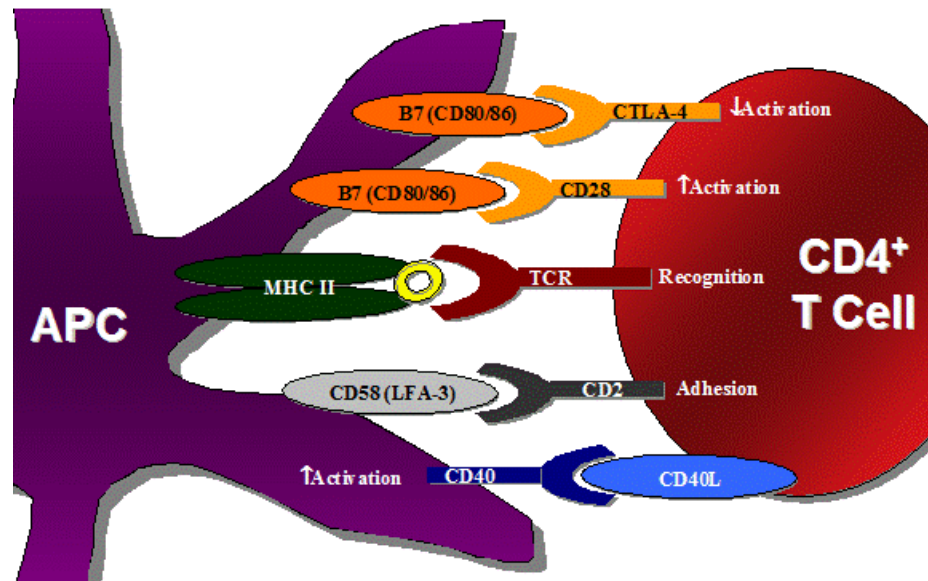
Nezrelé DC sídlia takmer vo všetkých orgánoch indukujúce T bunkovú anergiu. Je to spôsobené nízkou expresiou MHC molekúl, kostimulačných molekúl a prozápalových cytokínov. Polozrelé DC exprimujú veľké množstvo MHC molekúl (Signál 1) a kostimulačných molekúl (Signál 2), avšak neprodukujú žiadne cytokíny (Signál 3), takže nenavodia stimuláciu T bunkovej odpovede. Avšak indukujú produkciu IL-10 CD4<sup>+</sup> Treg. Zrelé DC exprimujú veľké množstvo MHC molekúl, kostimulačných molekúl a produkujú cytokíny, a poskytujú tak všetky signály potrebné k navodeniu imunitnej reakcie. Preto sa nazývajú ako imunogénne DC (Obr. 5) [121,122].

Mazmanian spolu s ďalšími výskumníkmi z Harvardovej univerzity popísali, že DC sú schopné prezentovať T bunkám i fragmenty polysacharidov, hoci dovtedy sa myslelo, že sú schopné prezentovať len peptidové fragmenty proteínov. Významnú úlohu zohráva črevná mikrobiota, ktorá produkciou určitých typov polysacharidov môže stimulovať Th1 imunitnú odpoveď. Ako náhle je nedostatok týchto polysacharidových stimulov, pri odpovedi na rôzne podnety (prach, peľové zrnká) prevládajú naopak bunky Th2 subpopulácie. Tie podporujú vznik protilátok izotypu IgE zodpovedných práve za alergické reakcie [123]<sup>17</sup>.

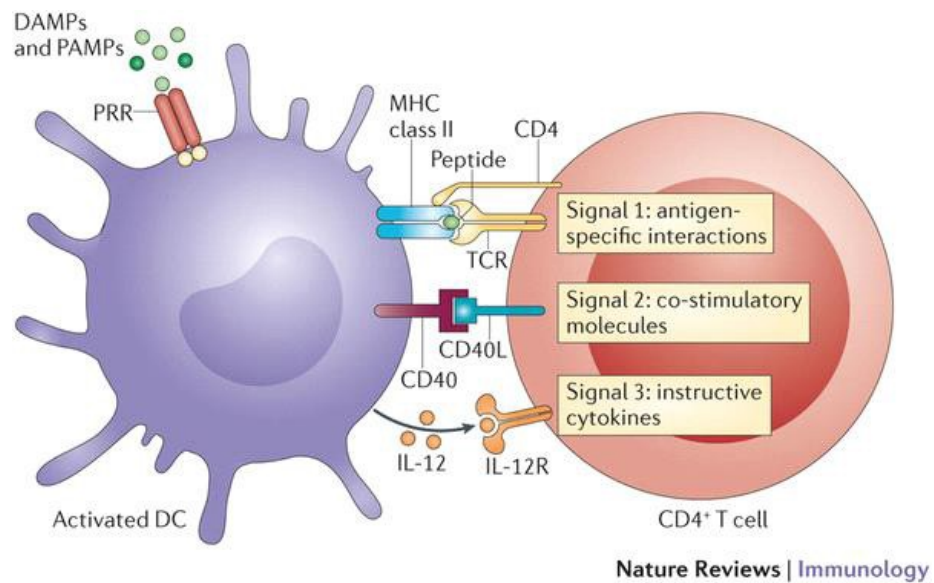
Antigény odvodené od bielkovín a lipidov môžu slúžiť ako vakcína na báze DC pri liečbe rôznych infekčných ochorení, či nádoroch [124]. U alergií, autoimunitných ochorení a transplantácií, DC podnecujú nechcené prirodzené a adaptívne reakcie, ktoré prispievajú k rozvoju choroby, ale takisto majú kapacitu tieto stavy potlačiť, pretože DC vedia nasmerovať prirodzenú a adaptívnu imunitnú odpoveď, preto sú nevyhnutným cieľom pri štúdiu mnohých ochorení a pri určovaní ochorenia [125].

---

<sup>17</sup> OWEN, J.A., *et al.* 2013.



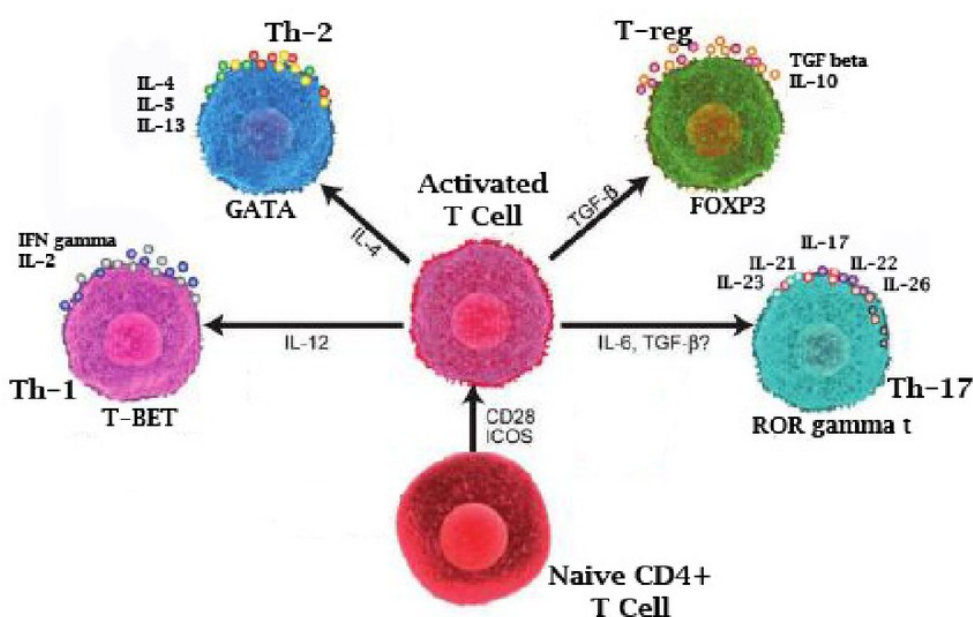
Obr. 4: **Interakcia medzi APC a T-lymfocytom** (Prevzaté z internetu od Eisenbarth a Hommann [www.som.ucdenver.edu](http://www.som.ucdenver.edu)). APC (Antigen-Presenting Cell) - bunky prezentujúce antigén; CD – Cluster of Differentiation; MHC (Major Histocompatibility Complex) - hlavný histokompatibilný komplex ; LFA – Lymphocyte-Function-Associated Antigen; CTLA-4 – Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4.



Obr. 5: **Signály nevyhnutné pri rozpoznávaní T buniek** (Prevzaté z internetu [www.astro.org](http://www.astro.org)). DAMP's – Damage-Associated Molecular Patterns; PAMP's – Pathogen-Associated Molecular Patterns; PRR – Pattern-Recognition Receptor; TCR – T-cell Receptor.

### 2.3.6 Subpopulácie naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov

K diferenciácii naivných T-lymfocytov do jedného subtypu efektorových buniek Th1, Th2, Th17 alebo Tregs dochádza behom niekoľkých dní kontaktu s APC (Obr. 6) [126]. Faktorov zodpovedných za vznik určitého typu efektorového T-lymfocytu je viacero: povaha a afinita antigénu, druh koreceptorových signálov, cytokínové prostredie, typ TCR signalizácie. Vo vývoji jednotlivého typu T buniek sú zapojené molekulárne mechanizmy, ktoré sú v prípade alergických reakcií ovplyvnené základnou reaktivitou alergika a odpovedajúcimi poruchami v regulácii imunitnej odpovedi.



Obr. 6: Cesty diferenciácie, expresia transkripčných faktorov a cytokínový profil rôznych subpopulácií CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov (Prevzaté z internetu [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)).

#### 2.3.6.1 Th2 lymfocyty

Th2 lymfocyty hrajú dôležitú úlohu v alergickej reakcii [113,127]. Experimenty na myších modeloch ukázali, že cytokínové prostredie hrá veľmi dôležitú úlohu v regulácii diferenciácie T-lymfocytov, rovnako tak sa môžu uplatniť i ďalšie faktory, ako je koncentrácia antigénu alebo expresia kostimulačných molekúl [128,129].

Diferenciácia Th2 lymfocytov prebieha po odpovedi APC na okolité antigény predovšetkým pod vplyvom IL-4 [113]. IL-4 sa viaže na svoje dva povrchové receptorové komplexy – jeden reťazec je zložený z IL-4Rα a spoločného γ receptorového reťazca (γc);

druhý reťazec tvoria IL-4R $\alpha$  a IL-13R $\alpha$  reťazce. Väzbou na tieto reťazce IL-4 indukuje produkciu transkripčného faktora STAT6 v naivných T-lymfocytoch a ďalšie signalizačné dráhy [130]. STAT6 následne aktivuje expresiu hlavného diferenciačného transkripčného faktora Th2 lymfocytov, GATA-3. GATA-3 a T-bet (transkripčný faktor Th1 lymfocytov) majú antagonistický účinok. Pokiaľ je zvýšená expresia IL-4 a GATA-3, dôjde k zníženému uvoľňovaniu T-bet, naopak pokiaľ je zvýšená hladina IFN- $\gamma$ , IL-12 a T-bet, produkcia GATA-3 je utlmená [131]. Pokusy na experimentálnych myších modeloch ukázali, že keď dôjde k utlmeniu génov pre GATA-3, dochádza k vymiznutiu hlavných prejavov astmy, eosinofílie v dýchacích cestách, produkcie hlienu a syntézy IgE [132].

Alergén-špecifické Th2 lymfocyty boli identifikované v periférnej krvi i v postihnutých tkanivách u alergických pacientov [133]. Cytokíny Th2 imunitnej odpovede (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) produkované Th2 lymfocytmi majú vplyv na mnohé patofyziologické mechanizmy u alergických pacientov. Tieto cytokíny vedú k produkcii alergén-špecifických IgE B-lymfocytmi (IL-4 a IL-13), majú vplyv na zhlukovanie žírnych buniek (IL-4, IL-9 a IL-13) a na maturáciu eozinofilov (IL-3, IL-5 a GM-CSF) a bazofilov (IL-3 a IL-4) [134]. Zvýšená Th2 cytokínová odpoveď bola detekovaná v periférnej krvi i v mieste alergického zápalu, napr. v dýchacích cestách u alergických pacientov [135]. Hlavná úloha Th2-lymfocytov i nimi produkovaných cytokínov v alergickej reakcii je týmto jednoznačne potvrdená.

### 2.3.6.2 Th1 lymfocyty

Th1 lymfocyty sú subpopuláciou Th lymfocytov, ktoré sa diferencujú z naivných CD4<sup>+</sup> lymfocytov pod vplyvom IL-12 a APC stimulovaných mikrobiálnymi antigénmi. Diferencované Th1 lymfocyty produkujú IFN- $\gamma$ , ktorý vedie k intracelulárnej deštrukcii fagocytovaných mikróbov tým, že aktivuje makrofágy. Z najrôznejších štúdií posledných dvoch dekád vyplýva vzájomná negatívna interakcia medzi Th1 a Th2 subpopuláciou. IFN- $\gamma$  produkovaný Th1 lymfocytmi potláča rozvoj Th2 imunitnej odpovede, naopak IL-4 produkovaný Th2 inhibuje produkciu IFN- $\gamma$  Th1 lymfocytmi a tým aj vývoj Th1 imunitnej odpovede [129,131]. Najrôznejšie štúdie dokazujú vzťah medzi zníženou hladinou IFN- $\gamma$  alebo zníženou schopnosťou produkcie tohto cytokínu v *in vitro* pokusoch v novorodeneckom a kojeneckom období detí, u ktorých sa neskôr vyvinuli alergické ochorenia (napr. astma, atopická dermatitída) [136]. Táto Th1/Th2 disbalancia je jedným

z najdôležitejších mechanizmov imunoregulácie. V prípade alergických ochorení tvorí patogenetický podklad už spomínanej hygienickej hypotézy. Hlavnú úlohu v polarizácii imunitnej reakcie do určitej Th odpovede (Th1, Th2, Th17 a Tregs) zohrávajú dendritické bunky a stimulácia pomocou mikrobiálneho antigénu, prípadne alergénom cez ich rôzne povrchové TLR.

Štúdie posledných rokov však poukazujú na fakt, že alergické ochorenia nie je možné vysvetliť iba mechanizmom posunu rovnováhy v prospech Th2. Do patogenézy alergických ochorení sú hlavne v chronických fázach zapojené aj ďalšie subpopulácie T-lymfocytov (Th1, Th17 a Tregs). Pri ľahších formách astmy a skorých štádiách atopickej dermatitídy je dominantná Th2 polarizácia, avšak s postupom ochorenia sa do popredia dostávajú Th1 bunky produkujúce IFN- $\gamma$  a CD8<sup>+</sup> cytotoxické T-lymfocyty [135,137]. Teóriu o vplyvu Th1 na alergický zápal podporili taktiež pokusy na myších experimentálnych modeloch, [138].

### 2.3.6.3 Th17 lymfocyty

Th1/Th2 rovnováha nie je sama o sebe schopná vysvetliť mechanizmy vedúce k vzniku imunopatologických stavov. Do imunopatologických reakcií a rovnako tak aj do patogenézy autoimunitných a alergických ochorení zasahujú i ďalšie subpopulácie T-lymfocytov, ako napríklad Th17 a Tregs [139,140].

T-lymfocyty schopné produkovať IL-17 sú pomenované podľa tohto cytokínu ako „Th17 lymfocyty“. Boli popísané v roku 2000 na ľudských a myšacích modeloch [141]. Ako kľúčový diferenciačný faktor je popísaný ROR $\gamma$ t [142]. Pre svoju diferenciáciu potrebujú Th17 kombináciu cytokínov odlišnú od tej, ktorá je dôležitá pre diferencovanie Th1 a Th2 buniek a to IL-1 $\beta$  a IL-23, alebo IL-1 $\beta$  s IL-6 *in vivo* a tak isto *in vitro*. U myší je potrebná iná kombinácia cytokínov, ktorá je popísaná v článkoch Bettelli *et al.* [143]; Veldhoen *et al.* [144] a McGeachy *et al.* [145].

### 2.3.6.4 T regulačné lymfocyty – Tregs

Tregs (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>) patria k ďalšej subpopulácii T-lymfocytov, ktorá zohráva úlohu v rozvoji alergie. Majú schopnosť suprimovať vznik Th1 a Th2 alergickej odpovede.



Vďaka tomu sú dôležitým regulačným prvkom v reakciách imunitného systému na alergény a tiež v patogenéze alergických ochorení [146]. Ich množstvo v periférnej krvi je približne 5 - 10 % z CD4<sup>+</sup> [147].

CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> tvoria podtyp Tregs – prirodzené Tregs (nTregs) vznikajúce v týmuse. Druhým podtypom sú indukované Tregs (iTregs) vznikajúce na periférii efektorových T buniek, ktoré sú vystavené antigénom. Táto populácia je charakteristická tým, že produkuje cytokíny, ktoré negatívne regulujú imunitnú reakciu: IL-10 a TGF-β [148,149].

Pôsobením Tregs dochádza k inhibícii expresie cytokínov Th2 v odpovedi na alergén u zdravýchnealergických jedincov [150].

Dôležité je podotknúť nejednotnosť charakterizácie Tregs, ktorá sa v jednotlivých článkoch častokrát odlišuje.

### **2.3.7 Schopnosť rozoznávať patogény - Pattern-recognition receptors PRR**

Nie len všetky subpopulácie DC, ale aj ďalšie bunky prezentujúce antigén, bunky vrodenej i adaptívnej imunity a dokonca tiež bunky, ktoré na prvý pohľad nesúvia s imunitným systémom, ako napríklad epitelové, endotelové bunky či fibroblasty, sú vybavené špeciálnymi tzv. vzorkovými receptormi PRR, ktoré dokážu detegovať typické molekulárne vzory prítomných mikroorganizmov alebo nebezpečné endogénne signály a spustiť imunitnú odpoveď. Tieto PRR sú exprimované nie len na bunkovom povrchu ale aj vo vnútri bunky, vyznačujú sa rozmanitosťou a detegujú široké spektrum molekulárnych druhov vrátane proteínov, sacharidov, lipidov a nukleových kyselín [151].

#### **2.3.7.1 Toll-like receptory - TLR**

Najviac študovanou skupinou PRR na DC sú receptory podobné TLR. Názov „Toll“ je gén a proteín nájdený u octomilky (*Drosophila melanogaster*) Thomasom Huntom Morganom a má dôležitú úlohu v imunitnom systéme tým, že kóduje receptor reagujúci na prítomnosť cudzorodých molekúl [152]. Objav TLR objasnil úlohu DC a ich význam pri obrane organizmov proti infekcii. Signalizácia cez TLR na DC sa považuje za

klúčovú pre ich funkciu, pretože dochádza k zvýšeniu expície kostimulačných molekúl a produkcie cytokínov, potrebných pre indukciu vhodnej imunitnej reakcie. [153].

TLR sprostredkované rozpoznávanie komenzálnych mikroorganizmov môže mať dôležitú úlohu v tkanivovej homeostáze, kde ako najporozuhodnejší príklad môžeme uviesť črevo. Blokáda TLR signalizácie vedie k narušeniu funkčnej bariéry a vzniku zápalu [154]. Ukázalo sa, že udržanie homeostázy a tolerancie voči črevnej mikrobiote je potrebná TLR signalizácia v DC [155,156].

U človeka rozlišujeme 10 TLR (TLR1 – TLR10) [157] a 13 TLR u myši spolu s ich ligandmi, ktoré sú uvedené v tabuľke 1 [158].

Tab. 1: **TLR a ich ligandy** (upravené podľa Takedu a Jeneway) [158] <sup>18</sup>

TLR	Ligand a ich pôvod
TLR1	Tri-acyl lipopeptidy (baktérie, mykobaktérie)
	Solubilné faktory ( <i>Neisseria meningitides</i> )
TLR2	Lipoproteíny/lipopeptidy (rôzne patogény)
	Peptidoglykán a lipoteichoová kyselina (G <sup>+</sup> baktérie)
	Lipoarabinomannan (mykobaktérie)
	Poriny ( <i>Neisseria</i> )
	Zymozan (huby)
TLR3	dsRNA (vírusy)
TLR4	LPS (G <sup>-</sup> baktérie)
	Taxol (rastliny)
TLR5	Flagelín (baktérie)
TLR6	Di-acyl lipopeptidy (mykoplazmy)
TLR7	ssRNA (vírusy)
	Imidazolquinoline, Loxoribine (syntetické komponenty)
TLR8	ssRNA (vírusy)
TLR9	CpG DNA (baktérie)
TLR10 (iba u ľudí)	Bez známeho ligandu
TLR11 (iba u myši)	Profilín ( <i>Toxoplasma gondii</i> )
TLR12 (iba u myši)	Profilín a profilínu podobné proteíny ( <i>Toxoplasma gondii</i> )
TLR13 (iba u myši)	ssRNA (bakteriálna ribozomálna RNA)

LPS – Lipopolysacharid; CpG DNA - Úseky v reťazci bakteriálnej DNA; ssRNA – jednovláknová RNA; dsRNA – dvojitá RNA

<sup>18</sup> MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

Jednotlivé subpopulácie DC majú odlišnú expresiu TLR, ktoré pravdepodobne prispievajú k ich funkčnej špecializácii. pDC exprimujú vysokými hladinami TLR7, TLR9 a u myši aj TLR12. mDC exprimujú ostávajúce TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6, 8, 10) a sú schopné zahájiť imunitnú odpoveď proti širokému spektru patogénov [159].

TLR sú integrálne transmembránové glykoproteíny typu I. a na základe značnej homológie v cytoplazmatickej oblasti sú členmi veľkej superrodiny zahrňujúcej interleukín-1 receptory (IL-1Rs). Cytoplazmatickú časť receptoru tvorí stabilná oblasť o približne 200 aminokyselinách, ktorá sa nazýva Toll/IL-1R doména (TIR) [160].

Na rozdiel od toho sa extracelulárna oblasť TLR a IL-1R značne líši → extracelulárna oblasť TLR sa vyznačuje opakujúcimi sa motívmi bohatými na leucín (Leucine-Rich Repeats; LRR), zatiaľ čo extracelulárna oblasť IL-1R obsahuje tri domény podobné imunoglobulínom [161].

Z hľadiska výskytu TLR ich rozdeľujeme do dvoch skupín:

- TLR1, 2, 4, 5, 6 sú lokalizované v cytoplazmatickej membráne buniek a ich LRR doména sa nachádza v extracelulárnom priestore, kde je najväčšia pravdepodobnosť výskytu jeho ligandu,
- TLR3, 7, 8, 9 sa nachádzajú intracelulárne v endozóme, ich receptor sa ukotvuje v membráne organel. TIR doména sa nachádza v cytoplazme, LRR sú umiestnené do vnútornej časti organel <sup>19</sup>.

### 2.3.7.2 Ďalšie membránové receptory rozpoznávajúce patogénne štruktúry

Po objave Toll-like receptorov sa začali objavovať ďalšie receptory, ktoré majú takisto úlohu pri rozpoznávaní patogénu. Na povrchu dendritických buniek sú exprimované lektínové receptory C-typu (CLR) a scavengerové receptory, naopak v cytoplazme nájdeme NOD-like receptory (Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptor; NLR) a RIG-like receptory (RLR) [153].

Spustenie niekoľkých PRR súčasne môže vyvolať rôzne vrodené imunitné reakcie, ktoré poskytujú rôznorodosť potrebnú pre formovanie účinnej adaptívnej imunitnej odpovede. Rozličné patogény majú odlišnú expresiu PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) a kombinácia týchto PAMP funguje ako tzv. fingerprint, ktorý aktivuje

---

<sup>19</sup> MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

špecifické PRR vedúce k interakcii signálnych dráh na prispôsobenie imunitnej odpovede proti konkrétnemu patogénu [153,162].

#### **2.3.7.2.1 Lektínové receptory C-typu**

Lektíny C-typu sú molekuly, ktoré svojou CRD (Carbohydrate Recognition Domain) oblasťou reagujú so sacharidovými zvyškami molekúl patogénov a takisto aj endocytozou sprostredkované receptory. Zaraďujeme sem Dectin-1 (tiež známy ako CLEC7A), Dectin-2 (známy ako CLEC6A), krvný DC antigén 2 proteín (BDCA, známy ako CLEC4C), DC-SIGN (DC-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin) [162–164], solubilný MBL (Mannose-Binding Lectin) [165].

#### **2.3.7.2.2 Scavengerové receptory (SR)**

*„Scavengerové receptory sú definované ako povrchové receptory na bunkách, ktoré sa typicky viažu na viaceré ligandy a pomáhajú v odstraňovaní vlastných alebo zmenených vlastných cieľov. Často fungujú pomocou mechanizmov zahrňujúcich endocytózu, fagocytózu, adhéziu a signalizáciu, ktoré vedú v konečnom výsledku k eliminácii degradovaných alebo škodlivých látok.“* [166]

Aktivita scavengerového receptora bola popísaná Dr. Michaelom Brownom a Dr. Josephom Goldsteinom, keď identifikovali receptory v makrofágoch, ktoré endocytovali a degradovali modifikovaný (acetylovaný), ale nie natívny lipoproteín LDL (Low-Density Lipoprotein) [167].

V súčasnosti existuje 8 tried scavengerových receptorov (triedy A-H), z ktorých mnohé majú viaceré názvy [166]. SR a ich rozdelenie do jednotlivých tried je nad rámec tejto diplomovej práce, avšak v článku PrabhuDasa *et al.* z roku 2014, je uvedená nomenklatura a štandardizácia scavengerových receptorov [166].

#### **2.3.7.3 Cytoplazmatické receptory rozpoznávajúce patogénne štruktúry**

Niektoré vírusy, ale aj baktérie majú schopnosť uniknúť z endozomálneho kompartmentu a perzistovať v cytoplazme. Preto si hostiteľské organizmy vyvinuli mechanizmy, ktorými sú schopné tieto patogénne organizmy odhaliť. Medzi

cytoplazmatické receptory sa zaraďujú NOD-like receptory (NLR) a RIG-like receptory (RLR) [151,168].

### 2.3.7.3.1 *NOD-like receptory (NLR)*

Po rozpoznaní ich špecifických MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern), NLR riadia prirodzenú a adaptívnu odpoveď; tak isto sa zúčastňujú na homeostáze v rôznych hostiteľských tkanivách prostredníctvom aktivácie transkripčných faktorov a MAPK kinázy (Mitogen-Activated Protein Kinase) [168].

Tieto receptory sú charakteristické svojou trojdoménovou štruktúrou. Doposiaľ je známych 22 členov NLR u ľudí, 34 u myší a dokonca niektoré bezstavovce, ako sú ježovky disponujú enormným množstvom viac ako 200 receptorov [169].

Keďže TLR môžu rozpoznávať podobné bakteriálne či vírusové zložky, TLRs a NODs synergicky aktivujú produkciu prozápalových cytokínov [151,170,171].

Podľa toho, ktorú efektorovú doménu obsahujú, je možné rodinu NLR rozdeliť na tri skupiny → NOD, NALP a NAIP (NLR Family of Apoptosis Inhibitory Protein). Proteíny rodiny NOD obsahujú doménu CARD (Caspase Activation and Recruitment Domains), v proteínoch rodiny NALP sa nachádza PYD (pyrinová doména) a u proteínov poslednej skupiny NAIP je prítomná BIR doména (Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat) [168,172].

Po naviazaní ligandu na receptor dôjde k asociácii RIP kinázy (Receptor-Interacting Protein; RIP) s týmto receptorom. Následne kináza interaguje s IKK (I $\kappa$ B Kinase; IKK) a ich vzájomnou aktivitou dochádza k uvoľneniu NF- $\kappa$ B od svojho inhibítora, ktorý je ubiquitinovaný a degradovaný. NF- $\kappa$ B sa translokuje do jadra, kde nastáva génová expresia. RIP kináza zároveň aktivuje MAP kinázy (p38, JNK, a ERK) , čo vedie k ďalšiemu ovplyvneniu génovej expresie bunky [173,174].

Druhú skupinu tvoria proteíny NALP, ktorých aktivácia sa spája so vznikom štruktúry nazývanej inflamazóm. Inflamazóm je proteínový komplex tvorený receptorom, kaspázou 1 a adaptorovým proteínom ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD). Kaspáza štiepi neaktívnu formu prozápalových cytokínov proIL-1 $\beta$  a proIL18 za vzniku aktívnej formy IL-1 $\beta$  a IL-18 [175]. Medzi dva najviac preskúmané proteíny tejto rodiny patria NALP1 a NLRP3 (známy aj ako NALP3 alebo cryopyrin). NLRP3 odpovedá na zmeny hladiny intracelulárneho draslíka, čím sa predpokladá, že niektoré toxíny a rovnako aj ATP neaktivujú receptor priamo, ale práve hladinou draslíka

v bunke [176,177]. NLRP3 reaguje aj na exogénne, tak aj na endogénne signály, zatiaľ čo bakteriálna RNA alebo toxíny interagujúce s NLRP3 sú látkami produkovanými patogénom, tak kryštáliky kyseliny močovej a vápenatého pyrofosfát dihydrátu sú vytvárané hostiteľským organizmom. Jedná sa o endogénny signál nebezpečia (DAMP) upozorňujúci na poškodenie organizmu, pretože kyselina močová i vápenatý pyrofosfát dihydrátu sú síce bežne sa vyskytujúce štruktúry v organizme, avšak len za stresových podmienok sa dokážu vytvárať kryštáliky, ktoré spúšťajú mechanizmy prirodzenej imunity [178,179].

Do tretej skupiny zaraďujeme NAIP proteíny, ktorých ligandom je flagelín; proteín z bičíku baktérií [180]. Otázka, či sa v signalizácii cez tieto receptory uplatňuje kaspáza-1, bola dlho nezodpovedaná a nebola jednoznačne potvrdená a ani vyvrátená. Avšak začiatkom roka 2015, vyšla publikácia v časopise „*Current Opinion in Immunology*“ o tom, že NLRC4 je zodpovedný za nábor a aktiváciu kaspázy-1 (CASP1). Ako náhle sú NAIP aktivované v prítomnosti ich príbuzných ligandov, sa zoskupia s NLRC4, aby vytvorili inflamazóm a aktivovali kaspázu-1 (CASP1) [181].

#### **2.3.7.3.2 RIG-like receptory (RLR)**

Ďalšou skupinou receptorov, ktoré rozoznávajú patogénne štruktúry sú helikázy podobné RIG – RIG-like receptory (RLR). Rozpoznávajú dvojvláknovú RNA (dsRNA) a nezávisle na TLR spúšťajú protivírusovú imunitnú reakciu. Medzi tieto receptory patria RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I.) a MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5) obsahujúce dve CARD domény, cez ktorých signalizáciu dochádza k aktivácii IRF3 a NF- $\kappa$ B a následne produkcii interferónov I- typu. Tretím členom týchto receptorov je LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2), v ktorého molekule sa CARD molekula nevyskytuje [182]. Modifikuje vírusovú RNA tým, že z vírusového nukleoproteínového komplexu odstraňuje proteíny alebo pomáha rozvinúť vlákno RNA, čím uľahčuje jej rozpoznanie RIG-I a MDA5 receptormi. Zdá sa, že to, aké receptory sú použité k rozpoznanu vírusovej RNA, koreluje s typom DC  $\rightarrow$  mDC využívajú k rozpoznanu vírusov RLR, zatiaľ čo pDC využívajú TLR [183].

## 2.4 Subpopulácie dendritických buniek

Vývojové štúdie naznačujú, že DC sa vyvíjajú nezávisle od monocytov a tkanivových makrofágov. Odlišné subpopulácie DC majú vnútorné rozdiely, ktoré vedú k funkčnej špecializácii vo vytváraní imunity. DC sú triedou buniek odvođených od kostnej drene, ktoré sa nachádzajú v krvi, epiteliálnych bunkách a lymfatických tkanivách [184].

DC nepredstavujú homogénnu populáciu leukocytov, ale jedná sa o niekoľko rôznych subpopulácií buniek, ktoré sa navzájom odlišujú lokalizáciou, morfológiou a expresiou povrchových molekúl. Nomenklatura jednotlivých subpopulácií nie je jednotná, odlišuje sa u ľudí a myší [185].

Táto diplomová práca sa zaoberá porovnaním dvoch populácií DC získaných z ľudskej puočníkovej krvi, a to:

- Konvenčné (myeloidné) dendritické bunky → cDC (mDC), DC1
- Plazmacytooidné dendritické bunky → pDC, DC2.

pDC je možné identifikovať podľa expisie CD123 (receptoru pre IL-3) a druhú populáciu, mDC detegujeme podľa znaku CD11c u ľudí. IL-3 je dôležitým rastovým faktorom pDC.

U ľudí všetky DC exprimujú vysoké hladiny molekúl MHC-II. triedy (HLA-DR) a chýbajú typické línie CD3 znakov (T bunka), CD19/CD20 (B bunka) a CD56 (NK bunka) [186].

### 2.4.1 Myeloidné dendritické bunky (mDC)

Charakteristické znaky mDC sú odlišné u ľudí a myší. Prvý náznak toho, že ľudské DC môžu mať podobnú distribúciu subpopulácií s myšami pochádza zo štúdie, kde sa zaoberali DC týmusu u ľudí [187]. U myší bolo doposiaľ objavených a popísaných 5 subpopulácií, ktoré sa vzájomne odlišujú expresiou znakov CD4, CD8 $\alpha$ , CD11b a CD205. Naopak ľudské mDC sú charakteristické expresiou CD11c. V periférnej krvi ľudí rozlišujeme dve populácie mDC, ktoré predstavujú 50% a 5-10% z celkovej populácie periférnych DC. Prvú populáciu CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>BDCA-1<sup>+</sup> (znak charakteristický pre DC; Blood Dendritic Cell Antigen; BDCA) predstavuje menej než 1 % periférnych

mononukleárných buniek (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) a je prekursorom Langerhansových buniek [188].

Druhú populáciu predstavuje  $CD11c^+CD1a^-BDCA-3^+$  tvoriaca len 0,05% PBMC a je prekursorom intersticiálnych DC [188,189]. Bolo zistené, že v CBMC (Cord Blood Mononuclear Cell; pupočníkovej krvi) sa nachádza viac mDC oproti PBMC či kostnej drene [190]. Separácia konvenčných (myeloidných) DC u ľudí založená na expresii CD11b, odhalila dve subpopulácie DC, a to  $CD11b^{low}$  s vlastnosťami podobnými myšim  $CD8^+ CD11b^{low}$  vrátane vysokej produkcie IL-12p70 [191,192].

mDC exprimujú typické antigény CD11c, CD13, CD33 a CD11b odpovedajúce myšim  $CD11c^+$  konvenčným DC. U ľudí mDC a monocyty exprimujú CD11c, ale nie CD16 a môžu sa rozdeliť na  $CD1c^+$  a  $CD141^+$ , ktoré sú homologické s myšimi klasickými DC exprimujúcimi CD11b ( $CD1c^+$ ) alebo CD8/CD103 ( $CD141^+$ ) [193]. Oboje, ľudské aj myšie mDC exprimujú CD13 a CD33 a CD32, imunitný inhibičný Fc receptor [194].

Ľudské  $CD141^+$  ( $BDCA-3^+$ ) mDC exprimujú TLR3 (Toll-Like Receptor; TLR) a uvoľňujú množstvo IL-12 a IFN- $\beta$  v odpovedi na aktiváciu s poly I:C (Polyinosinic:Polycytidylic Acid; poly I:C), dsRNA, čo je ligand pre TLR3 [193,195]. Exprimujú lektínovú doménu C-typu 9A (CLEC9A), ktorá je receptorom detegujúcim antigény nekrotických buniek [196], a sú teda schopné fagocytovať mŕtve bunky. Fragmenty pohltенých buniek uľahčujú krížovú prezentáciu (cross-prezentáciu; cross-presentation). [197,198]. Rovnako ako myšie  $CD8a^+$  mDC, tak aj ľudské  $CD141^+$  neexprimujú transkripčný faktor IRF4 (Interferon-Regulatory Factor), ďalej CD11b a TLR7 [198]. Ľudské hematopoetické progenitorové bunky sa diferencujú na  $CD141^+$  v prítomnosti Flt3L, kľúčového regulátora pre vývoj DC [199]. Ľudské tkanivové  $CD1c^+$  DC sa zdajú byť viac aktivované z hľadiska expzie daných znakov - CD80, CD83, CD86 a CD40 oproti ich krvným analógom [200,201].

#### **2.4.2 Plazmacytoidné dendritické bunky (pDC)**

pDC boli pomenované podľa morfológie pripomínajúcej plazmatické bunky [202]. Patria medzi bunky vrodenej imunity, ktoré cirkulujú v krvi a nachádzajú sa v periférnych lymfoidných orgánoch. Vyvinuli sa z hematopoetických kmeňových buniek kostnej drene a tvoria menej než 0,4 % PBMC [203]. Množstvo pDC v CBMC je o niečo málo vyššie než v PBMC, avšak najvyššie počty sú prítomné v kostnej dreni [190]. pDC neexprimujú typické myeloidné antigény, ako sú CD14, CD16 a CD11c [204], naopak sú



charakterizované expresiou CD123, CD303 a CD304 [193]. Majú dôležitú úlohu v obrane proti vírusovým infekciám, čo znamená, že rozpoznávajú vírusové nukleové kyseliny prostredníctvom TLR7 a TLR9 a v odpovedi na ne produkujú IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . Na svojom povrchu nesú receptor pre IL-3 (CD123) a navyše BDCA-2 a BDCA-4 u ľudí<sup>20</sup> [203,204].

Indukcia IFN I. triedy extracelulárnymi baktériami sa pozorovala len u *Escherichia coli* a u *Staphylococcus aureus* [205].

Aktivácia pDC je sprostredkovaná skupinou patogénnych senzorov PRR obsahujúcich TLRs a RIG-I-like receptory (Retinoic Acid-Inducible Gene I-Like Receptor; RLRs) a iné, čo následne vedie k produkcii prozápalových cytokínov a IFN I. [206]. pDC exprimujú vysoké hladiny TLR7 a TLR9, ktoré prenášajú signály z vírusových a vlastných nukleových kyselín, predovšetkým CpG DNA baktérií [207]. Práve vyizolované pDC z krvi neindukujú naivné T bunky efektívne a tiež nie sú schopné takej aktivácie ako mDC [208]. Všeobecne sa pDC považujú za bunky schopné preferenčne polarizovať T-lymfocytárnu imunitnú odpoveď Th2 smerom [209]

---

<sup>20</sup> Myšie pDC exprimujú CD11c<sup>low</sup>, CD8a, B220, BST-2/Tetherin (mPDCA) a Siglec-H a sú negatívne na CD11b [156,193].

### 3 MATERIÁLY A METÓDY

#### 3.1 Prístroje

Tab. 2: Zoznam použitých prístrojov

Prístroj	Výrobca
Automatické pipety	Pipetman Concept, Gilson, USA
Multikanálové pipety	Finnipette, Thermo Fischer Scientific, USA
Box pre molekulárnu biológiu	MSC Advantage, Thermo Scientific, USA
Box s laminárnym prúdením	Sentinel Gold, ESCO, Singapur
Box s laminárnym prúdením	HOTTE MSC.12 STD GAZ, Jouan, Francúzsko
Centrifúga	Universal 30 RF, Hettich, Nemecko
Centrifúga	Universal 320R, Hettich, Nemecko
Centrifúga	Micro 22R, Hettich, Nemecko
CO <sub>2</sub> inkubátor	ESCO CellCulture Incubator CO <sub>2</sub> , Singapur
Mikroskop	Olympus BX 41, Japonsko
Prietokový cytometer	BD FACS Canto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA
Fotometer mikrotitračných doštičiek	Sunrise- Basic Tecan, Tecan Austria, GmbH, Švajčiarsko
Premývačka mikrotitračných doštičiek MRW (AM60)	Dynex Technologies, USA
Magnetická miešačka	Arex, VELP Scientifica, Európa
Analytické váhy	AB204 Mettler Toledo, Švajčiarsko
Predvážky	EK-400H, A&D Company, Limited, Japonsko
Vortex	Vortex Genie K-550-GE, Scientific Industries Inc., USA
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA

Pri práci bolo použité veľké množstvo laboratórneho plastu a skla – špičky, ependorfky, skúmavky, Pasteurove pipety, mikrotitračné doštičky (24-, 96-jamkové), kadičky,...

Ďalej boli pri práci použité aj chladničky, v ktorých boli uchovávané kity pre magnetickú separáciu a aj pripravované roztoky či protilátky, a mraziaci box, kde boli uchovávané a zmrazované supernatanty bunkových kultúr a stimulátory.

### 3.2 Roztoky, chemikálie a komerčné súpravy

Tab. 3: Zoznam použitých chemikálií, stimulantov a komerčných súprav

Chemikálie	Výrobca
FTS – fetálne teľacie sérum (používané pre tkanivové kultúry)	Cambrex, USA
FTS (používané pre ELISA)	Gibco, USA
Türkov roztok	Vakos, Praha
Heparin	Zentiva v.n., Nizozemsko
Gentamycín	Pharmaceuticals dd, Slovinsko
L-glutamin	Sigma- Aldrich, USA
Histopaque ® 1077	Sigma- Aldrich, USA
RPMI 1640 Lonza (médium pre DC)	BioWhittaker, Belgicko
RPMI-1640 Sigma (médium pre kokultivácie)	Sigma- Aldrich, USA
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma- Aldrich, USA
Leukocyte Activation Cocktail (LAC), with BD GolgiPlug™	BD Biosciences, USA
Citronan sodný	Lachema, Česká republika
NaOH	Lachema, Česká republika
Sacharóza	Penta, Česká republika
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lachema, Česká republika
HCl	Lachema, Česká republika
NaCl	Penta, Česká republika
KCl	Penta, Česká republika
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	Penta, Česká republika
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Penta, Česká republika
Kyselina citrónová	Lachema, Česká republika
Bovine albumine serum (BSA), Trisma	Sigma- Aldrich, USA
75% etanol	Lekáreň Všeobecnej fakultnej nemocnice
N,N-dimethylformamid (DMF)	Merck, Nemecko
β- merkaptoethanol (ME)	Sigma- Aldrich, USA
Tween® 20	Sigma- Aldrich, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma- Aldrich, USA
2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1- yl)ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma- Aldrich, USA

3,3,5,5-tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma- Aldrich, USA
Trizma® hydrochloride buffer solution; Tris (hydroxymetyl)-aminomethan	SONY Biotechnology, USA
Streptavidin s naviazanou chrenovou peroxidázou	Immunotech Inc., USA
Primárne monoklonálne a sekundárne biotinylované protilátky	R&D System Inc., USA
Rekombinantné cytokíny ELISA	R&D System Inc., USA
autoMACS Rinsing Solution; MACS Solution	MACS, Miltenyi Biotec, Nemecko
Diluent Buffer	BD Biosciences, USA
Fix/Perm Buffer	BD Biosciences, USA
TF Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, USA
<b>Stimulanty</b>	<b>Výrobca</b>
<i>E. coli</i> O83:K24:H31 (vakcína Colinfant Newborn)	Dyntec spol. s.r.o., Česká republika
<b>Komerčné súpravy</b>	<b>Výrobca</b>
Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit Human	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
CD34 MicroBead Kit Human	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
CD4+ Tcell Isolation Kit	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
Human IL-10 DuoSet	RD Systems, USA

#### ❖ Türkovi roztok

- 5-krát riedený v destilovanej vode (dH<sub>2</sub>O)

### 3.2.1 Roztoky používané pri intracelulárnom farbení buniek

#### 0,5 % roztok BSA

- do 100 ml fyziologického roztoku, bolo pridané 0,5 g BSA

#### Fix/Perm Buffer – fixačný a permeabilizačný roztok

- roztok bol pripravený v pomere 3:1
- 3 ml riediaceho roztoku + 1 ml fixačného a permeabilizačného roztoku

#### Perm/Wash Buffer – premývací roztok

- roztok bol pripravený v pomere 1:4
- 4 ml deionizovanej vody + 1 ml premývacieho roztoku

### 3.2.2 Roztoky používané pri detekcii cytokínov ELISA testom

#### **PBS = fyziologický roztok**

- NaCl (9 g)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (1,2 g)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,2 g)
- Doplnené do 1 litra dH<sub>2</sub>O

#### **PBS pre IL-10**

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- upravené pH na 7,2 – 7,4

#### **Blokovací roztok**

- 5 % sacharóza (5 g)
- 0,05 % NaN<sub>3</sub> (0,05 g)
- 1 % BSA v PBS

#### **Riediaci roztok (TBS)**

- 20 mM Trizma (tris báza) (0,2423 g)
- 150 mM NaCl (0,876 g)
- doplnené do 100 ml dH<sub>2</sub>O a upravené pH pomocou HCl na 7,3
- 0,1 % BSA
- 0,05 % Tween

#### **Premývací roztok**

- PBS + 0,05 % Tween (na 0,9995 l PBS bolo pridané 500 µl Tweenu)

#### **Vyvolávací roztok (substrát) – na jednu doštičku**

- TMB ( 3 ml)
- citrátový pufor (3 ml)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µl)

#### **TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidin)**

- 200 mg (TMB) v 135 ml dimethylformamidu (DMF)
- doplnené do 500 ml dH<sub>2</sub>O a uchovávané v tmavej fľaši v chladničke

### Citrátový pufo

- 0,1 M citrónan sodný (2,94 g do 100 ml dH<sub>2</sub>O)
- Upravené pH na 4,2 nasýteným roztokom kyseliny citrónovej

### 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – zastavenie reakcie

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 ml)
- H<sub>2</sub>O (80 ml)

### 3.2.3 Médiá a roztoky pre tkanivové kultúry

Tab. 4: Zoznam použitých roztokov pre bunkové kultúry

Médiá	Výrobca
RPMI 1640 Lonza	BioWhittaker, Belgicko
RPMI 1640 Sigma	Sigma-Aldrich, USA

#### **Médium pre mDC – celkový objem 100 ml**

- RPMI 1640 LONZA 88,79 ml
- HEPES 0,002 M 0,2 ml
- Glutamin 1 ml
- Gentamycín 40 mg/l 0,1 ml
- FTS Cambrex 10 ml

#### **Médium RPMI Sigma (pre ostatné bunkové kultúry) – celkový objem 100ml**

- RPMI 1640 Sigma 88,79 ml
- HEPES 0,002 M 0,2 ml
- Glutamin 1 ml
- Gentamycin 40 mg/l 0,1 ml
- FTS 10 ml

#### **Médium pre pDC**

- RPMI Sigma suplementované (vid' prípravu média RPMI Sigma)
- Flt3L 100 ng/ml
- IL-3 20 ng/ml
- ME ( $\beta$ - Merkapt ethanol) 50  $\mu$ M/ml

### 3.3 Protílátky

Tab. 5 – 7: Protílátky použité pri analýze na prietokovom cytometri

Protílátky použité pri meraní mDC	Fluorochróm	Výrobca
CD83 anti-human	PE	Exbio, a. s.
CD11c anti-human	PE-Cy7	Exbio, a. s.

Protílátky použité pri meraní pDC	Fluorochróm	Výrobca
CD83 anti-human	PE	Exbio, a. s.
CD123 anti-human	FITC	BD Biosciences; Exbio, a. s.

Protílátky použité pri intracelulárnom farbení	Fluorochróm	Výrobca
CD4 anti-human	APC-Cy7	Exbio, a. s.
T-bet anti-human (Th1/Th2)	FITC	BD Bioscience; SONY
GATA3 anti-human (Th1/Th2)	PE	BioLegend; SONY
IL-4 anti-human (Th1/Th2)	PE-Cy7	BioLegend; SONY
IL-13 anti-human (Th1/Th2)	APC	BioLegend; SONY
IFN- $\gamma$ anti-human (Th1/Th2)	PerCP-Cy5.5	BD Bioscience; SONY
ROR $\gamma$ t anti-human (Th17/Treg)	FITC	BD Bioscience
FoxP3 anti-human (Th17/Treg)	APC	Exbio, a. s.; eBioscience
IL-22 anti-human (Th17/Treg)	PE	BioLegend; SONY
IL-17A anti-human (Th17/Treg)	PerCP-Cy5.5	BD Bioscience; SONY
IL-10 anti-human (Th17/Treg)	PE-Cy7	BioLegend; SONY

### 3.4 Použité programy

- Software Diva 6.1.2. (Becton&Dickinson, Franklin Lakes, NJ)
- Software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)
- Software FlowJo 7.2.2. (TreeStar, Ashland, OR)

## 3.5 Metodika

### Práca s bunkovými kultúrami

Celá práca s bunkovými kultúrami bola vykonávaná v laminárnom boxe za použitia sterilných roztokov, pipiet, špičiek, pipetovacích nastavcov a laboratórneho plastu (skúmavky, doštičky,...). Bunky boli kultivované v inkubátore pri 37 °C a v atmosfére 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.5.1 Získavanie a izolácia mononukleárných buniek z pupočníkovej krvi (CBMC)

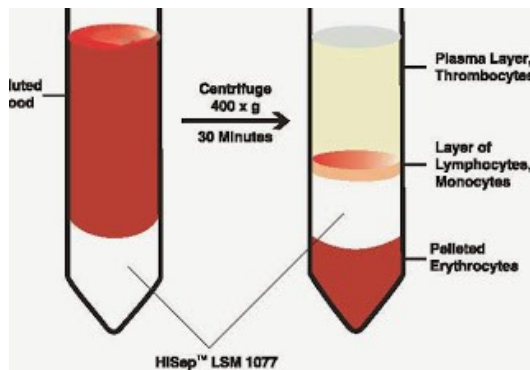
Bunky boli získavané z pupočníkovej krvi, ktorá bola odoberaná po podpísaní písomného informovaného súhlasu na jej odobranie v Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí. Bolo odoberané 30 ml krvi do sterilnej uzatvárateľnej sklenenej banky, ktorá obsahovala 300 µl Heparínu (300 J) (100-krát nariedený; 10 J heparínu/ml)<sup>21</sup>.

- Získaná krv bola zriedená v pomere 1:1 s MEM-om a následne navrstvená do 6-8 15 ml skúmaviek (podľa objemu krvi) na 3 ml Histopaque,
- po 30 minútovej centrifugácii pri 20 °C a 400 g bola získaná frakcia CBMC (Obr. 7),
- prstenec leukocytov bol následne pomocou pasturovej pipety odobraný do nových skúmaviek, doplnený fyziologickým roztokom a v ďalšom kroku prebehla centrifugácia 10 min pri 20 °C a 250 g,
- supernatant bol zliaty a bunky ešte dvakrát premyté fyziologickým roztokom,
- nakoniec bolo k bunkám pridaných 5 ml MEM-u, čím boli pripravené na počítanie.

---

<sup>21</sup> 10 J = 10 jednotiek

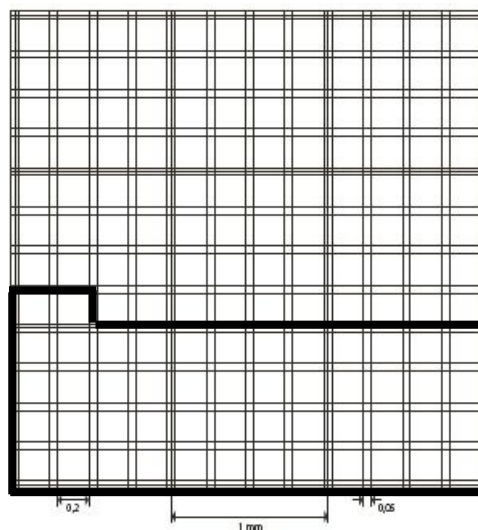




Obr. 7: Získaná frakcia mononukleárných leukocytov po centrifugácii (Prevzaté z internetu <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.cz>).

### 3.5.2 Počítanie buniek

Získané bunky boli rozsuspendované v MEM-u (vid' postup vyššie) a uložené na ľade. Z tohto objemu bolo odobraté 50  $\mu$ l média, ku ktorému bolo pridaných 950  $\mu$ l Türkovho roztoku. Bunky boli následne spočítané v Bürkerovej komôrke pod svetelným mikroskopom. Komôrka, ktorá je rozdelená trojitými čiarami na 9 väčších štvorcov, obsahuje v jednom tomto štvorci ešte 16 menších štvorcov. Z plochy komôrky boli spočítané bunky vnútri 50 menších štvorcov a rovnako aj tie, ktoré sa dotýkali dvoch z jeho štyroch strán (počítanie do „L“) (Obr. 8). Získaný výsledok odpovedal koncentrácii buniek na 1ml.



Obr. 8: Bürkerová komôrka. Vyznačená je oblasť 50 počítaných štvorcov (Prevzaté z internetu <http://www.thermofisher.cz>).

### 3.5.3 Separácia mDC pomocou magnetických guľičiek

Po celú dobu separácie bolo dôležité pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C. Práca prebiehala s fixným množstvom buniek  $2 \times 10^7$ , ktoré boli získané izoláciou na hustotnom gradiente s použitím Histopaque.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guľičkami) prebiehal podľa protokolu:

1. Bolo odobrané potrebné množstvo buniek do skúmavky a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 300  $\mu$ l AutoMacs roztoku;
3. následne bolo do skúmavky pridané 100  $\mu$ l FcR Blocking Reagent a 100  $\mu$ l Non-Myeloid Dendritic cell antibody-Biotin cocktail;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 10 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C),
5. po inkubácii boli bunky premyté v 5 ml AutoMacs roztoku a opäť scentrifované; supernatant bol zliaty a bunky premyté druhýkrát,
6. potom bola paletka buniek rozsuspendovaná v 400  $\mu$ l AutoMacs roztoku a bolo pridaných 100  $\mu$ l Anti-Biotin MicroBeads;
7. bunky boli opäť dôkladne premiešané a inkubované 15 minút v chladničke;
8. nakoniec boli bunky poslednýkrát premyté v 5 ml roztoku a scentrifugované;
9. po zliatí supernatantu bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 500  $\mu$ l AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu.

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;
2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premytá minimálne 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia, ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100  $\mu$ m);
4. po prekvapnutí suspenzie bola kolónka premytá 2 ml roztoku.

Po separácii bola získaná suspenzia buniek scentrifugovaná a následne bol spočítaný počet buniek v Bürkerovej komôrke. Separáciou boli získané mDC, ktoré sa

následne stimulovali 24 hodín s *E. coli* O83 v médiu pre dendritické bunky (mDC médium) v pomere 1:10 v inkubátore.

Po 24 hodinách prebehlo počítanie buniek a ich nasadenie do 24-jamkovej doštičky spolu s CD4<sup>+</sup> bunkami získanými separáciou pomocou magnetických guličiek (viď kap 3.5.5) z izolovaných buniek pupečníkovej krvi pomocou histopaque. Nasadených do doštičky bolo 100 000 mDC a na kokultiváciu k nim bolo pridaných  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> buniek a doplnené do 1,5 ml médiom RPMI Sigma (namiešaný roztok s FTS, Heps, Gentamycín) a doštička bola vložená do termostatu na 6 dní. Zvyšné bunky sa ešte v ten deň ofarbili pomocou CD11c a CD83 a následne sa zmerali na prietokovom cytometri. Merané a porovnávané boli stimulované vzorky s kontrolou, ktorá *E. coli* O83 neobsahovala.

Po šiestich dňoch boli k suspenzii buniek v 24-jamkovej doštičke pridané protilátky CD3 a CD28 vo finálnej koncentrácii 1 µg/ml, takisto bolo pridané aj 500 µl média RPMI Sigma. Po ďalších troch dňoch bol k bunkám v doštičke pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a približne po 5 hodinách boli bunky intracelulárne zafarbené, pričom v postupe práce bol dodržiavaný protokol od výrobcu (viď kap. 3.5.6).

#### **3.5.4 Separácia CD34<sup>+</sup> pomocou magnetických guličiek**

Rovnako ako pri príprave buniek na separáciu mDC, ktorá je popísaná vyššie, tak aj pri separácii CD34 bolo dôležité celú dobu pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C. Aj v tomto prípade bolo potrebné pracovať s fixným množstvom buniek  $2 \times 10^7$ , ktoré boli získané izoláciou na hustotnom gradiente s použitím Histopaque.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guľčkami):

1. Bolo odobrané potrebné množstvo buniek do skúmavky a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 300 µl AutoMacs roztoku;
3. následne bolo do skúmavky pridané 100 µl FcR Blocking Reagent a 100 µl CD34 MicroBeads;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 30 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C);

5. po inkubácii boli bunky premyté v 5 ml AutoMacs roztoku a opäť sцентриfované;
6. supernatant bol zliaty a následne bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 500  $\mu$ l AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu.

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;
2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premyli ju aspoň 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100  $\mu$ m);
4. po prekvapnutí suspenzie bola kolónka premytá 1 ml roztoku;
5. bunky ostali naviazané na magnetu a boli získané pomocou piestu, spôsobom, že kolónka bola odobraná z magnetu a vložená do novo pripravenej skúmavky; do kolónky bolo pridané dvakrát po 1 ml AutoMacs roztoku a pomocou piestu boli bunky vytlačené do skúmavky = CD34 pozitívna selekcia.

Separáciou bola získaná frakcia CD34<sup>+</sup> buniek, ktoré boli následne stimulované 6 dní pomocou Flt3L, IL-3, a  $\beta$ -merkaptoetanolu (ME). Stimulácia mala za účel pomnoženie populácie buniek a vznik pDC, pre ktoré sú dané stimulatory dôležité. Stimulatory boli k bunkám pridávané v konštantných koncentráciách každý tretí deň: Flt3L – koncentrácia 100 ng/ml, koncentrácia IL-3 20 ng/ml a koncentrácia ME bola 50  $\mu$ M/ml. Po šiestich dňoch boli bunky spočítané a nastimulované *E. coli* O83, pričom boli porovnávané s bunkami nestimulovanými. Ďalší deň boli bunky opäť spočítané a nasadené do 24-jamkovej doštičky spolu s CD4<sup>+</sup> bunkami, ktoré boli získané separáciou pomocou magnetických guľičiek (viď kap 3.5.5) z izolovaných buniek pupočníkovej krvi pomocou Histopaque. Rovnako ako u mDC (viď kap 3.5.3) tak aj u pDC bolo nasadzovaných 100 000 pDC a na kokultiváciu k nim bolo pridaných 1 x 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> buniek a doplnené do 1,5 ml médiom RPMI Sigma (namiešaný roztok s FTS, Heps, Gentamycín) a doštička bola vložená do termostatu na ďalšie 4 dni. Po uplynutí štyroch dní boli k suspenzii buniek v 24-jamkovej doštičke pridané protilátky CD3 a CD28 vo finálnej koncentrácii 1  $\mu$ g/ml, takisto bolo pridané aj 500  $\mu$ l média RPMI Sigma. Po ďalších troch dňoch bol k bunkám v doštičke pridaný LAC a približne po 5 hodinách boli bunky intracelulárne zafarbené, pričom v postupe práce bol dodržovaný protokol od výrobcu (viď kap 3.5.6).

### 3.5.5 Separácia CD4<sup>+</sup> pomocou magnetických guľičiek

Rovnako ako pri predošlých dvoch separáciách, aj tu bolo podstatné celú dobu pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guľičkami) prebiehal podľa protokolu:

1. Po 1 hodinovej inkubácii buniek v MEM-u, bola do 50 ml skúmavky odobraná neadherovaná frakcia buniek, ktorá bola dôkladne prepláchnutá fyziologickým roztokom a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 40 µl AutoMacs roztoku (platí pre množstvo 10<sup>7</sup> buniek);
3. následne bolo do skúmavky pridané 10 µl CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-antibody cocktail;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 5 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C),
5. po inkubácii bolo k bunkám pridaných 30 µl AutoMacs roztoku a 20 µl CD4<sup>+</sup> T Cell MicroBead Cocktail (platí pre množstvo 10<sup>7</sup> buniek);
6. bunky boli opäť dôkladne premiešané a inkubované 10 minút v chladničke;
7. nakoniec po inkubácii bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 2 ml AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu .

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;
2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premytá minimálne 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100 µm);
4. po prekvapkaní suspenzie bola kolónka premytá 2 ml roztoku.

Separáciou boli získané naivné CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, ktoré sa pridávali na kokultiváciu k mDC (viď kap 3.5.3) a rovnako tak aj k pDC (viď kap. 3.5.4).

### 3.5.6 Intracelulárne farbenie buniek

Počas celého protokolu práca prebiehala s bunkami uloženými na ľade.

Postup práce pri intracelulárnom farbení CD4<sup>+</sup> ako u mDC, tak aj pDC:

1. Z 24-jamkovej mikrotitračnej doštičky boli odobrané bunky (kontrola (K) a *E. coli* O83) do skúmaviek a scentrifugované pri 250 g, 5 minút, 4 °C;
2. supernatant kultúr bol odobraný do 2 ml ependorfky pre následné stanovenie cytokínov metódou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), supernatanty boli následne zamrazené pri -20 °C;
3. k bunkám v skúmavkách bolo pridané po 100 µl 0,5 % roztoku BSA a 4 µl monoklonálnej protilátky (mAb) CD4<sup>+</sup> a boli inkubované 30 minút v chlade a tme;
4. medzitým bol pripravený fixačný a permeabilizačný roztok („Fix/Perm Buffer“);
5. po inkubácii bolo k bunkám pridané po 2 ml 0,5 % BSA, skúmavky boli zvortexované a scentrifugované;
6. supernatant bol zliaty, skúmavky zvortexované a bolo pridané po 1 ml fixačného roztoku, ktorý bol pripravený vopred a inkubované 45 minút v chlade a tme;
7. počas inkubácie bol pripravený premývací roztok („Perm/Wash Buffer“);
8. takisto bola do ependorfiek pripravená zmes mAb pre intracelulárne farbenie jednotlivých subpopulácií buniek, a to: Th1/Th2 a Th17/Treg; bolo pridávané po 5 µl z každej mAb na skúmavku (mAb boli udržiavané na ľade a v tme);
9. po 45 minútovej inkubácii bolo do skúmaviek pridané po 1 ml pripraveného premývacieho roztoku a boli scentrifugované;
10. bunky boli premyté 2 ml premývacieho roztoku;
11. supernatant bol zliaty a bolo pridaé po 200 µl premývacieho roztoku do každej skúmavky, dôkladne rozsuspendované a 100 µl z jednej skúmavky bolo prenesených do ďalšej skúmavky → jedna dvojica skúmaviek pre farbenie populácie Th1/Th2, druhá dvojica pre Th17/Treg;
12. následne bolo pridané po 25 µl z pripravenej zmesi mAb na jednu skúmavku a boli inkubované 45 minút v chlade a tme;
13. nakoniec bola suspenzia dvakrát premytá 2 ml premývacieho roztoku a scentrifugovaná; supernatant bol zliaty a pridaný finálny objem 300 µl 0,5 % BSA, čím boli vzorky pripravené na meranie prietokovým cytometrom.

### 3.5.7 ELISA

ELISA je jednou z najpoužívanejších imunochemických metód slúžiacich k detekcii rôznych analytov (protilátok alebo antigénov). Ku značeniu protilátky sa využíva enzým – najčastejšie chrenová peroxidáza – naviazaný na Fc fragment protilátky. Reakcia enzýmu so substrátom sa prejaví vznikom farebného produktu. Výsledná detekcia intenzity farebného produktu sa stanovuje spektrofotometricky.

#### Postup práce

Daný postup práce bol použitý pre všetky cytokíny okrem IL-10, ktorý bol odlišný.

##### 1. Deň

V prvý deň boli naviazané primárne monoklonálne protilátky (mAb), ktoré boli rozriedené v PBS podľa údajov u jednotlivých zamrazených alikvót (7,45 ml PBS + 50  $\mu$ l mAb). Následne boli mAb napipetované do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky NUNC po 75  $\mu$ l/jamka a inkubované pri laboratórnej teplote do druhého dňa. Tak isto boli pripravené aj potrebné roztoky: premývací, blokovací a riediaci roztok, ktoré boli uchovávané v chladničke pri 5 °C.

##### 2. Deň

Na začiatku druhého dňa boli všetky jamky 3x premyté 200  $\mu$ l premývacieho roztoku. Po premytí bolo do doštičky nasadených 150  $\mu$ l riediaceho roztoku a doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po hodine bola doštička opäť premytá a bolo nanesené po 50  $\mu$ l/jamku štandardov a vzoriek, vždy v dubletoch. Pre prípravu jednotlivých vzoriek boli použité rôzne riedenia, v závislosti od typu vzorky (Tab. 9). Doštička bola inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote a následne prikrytá a uložená do chladničky do ďalšieho dňa.

##### 3. Deň

Posledný, tretí deň bolo po premytí doštičky nasadených po 50  $\mu$ l biotinylovanej protilátky opäť riedenej v riediacom roztoku podľa údajov u rozmrazených alikvót. Doštička bola inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po premytí doštičky bol pridaný do jamiek streptavidín riedený v pomere 1: 1000 v riediacom roztoku (TBS) po 50  $\mu$ l na jamku a doštička bola

inkubovaná 20 minút pri laboratórnej teplote na tmavom mieste. Po poslednom premytí doštičky, bol pridaný vyvolávací roztok (substrát) po 50  $\mu\text{l}$  na jamku a nechal sa inkubovať približne 5-10 minút. Reakcia bola zastavená 50  $\mu\text{l}$ /jamku 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Výsledok bol zmeraný spektrofotometricky.

### **Postup práce pre IL-10**

#### **1. Deň**

V prvý deň boli naviazané mAb, ktoré boli rozriedené v koncentrovanom PBS bez nosičového proteínu. Následne boli mAb napipetované do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky NUNC po 75  $\mu\text{l}$ /jamka a inkubované pri laboratórnej teplote do druhého dňa. Tak isto boli pripravené aj potrebné roztoky: premývací, blokovací a riediaci roztok, ktoré boli uchovávané v chladničke pri 5 °C.

#### **2. Deň**

Na začiatku druhého dňa boli všetky jamky 3x premyté 400  $\mu\text{l}$  premývacieho roztoku. Po premytí bolo do doštičky nasadených 150  $\mu\text{l}$  riediaceho roztoku a doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po hodine bola doštička opäť premytá a bolo nanosených po 50  $\mu\text{l}$  na jamku štandardov a vzoriek, vždy v dubletoch. Pre prípravu jednotlivých vzoriek boli použité rôzne riedenia, v závislosti od typu vzorky a boli inkubované 2 hodiny pri laboratórnej teplote (Tab. 8). Po uplynutí časového intervalu 2 hodín, boli jamky opäť premyté premývacím roztokom a bolo pridaných 50  $\mu\text{l}$  detekčnej (biotinylovanej) protilátky riedenej v riediacom roztoku do každej jamky a následne bola doštička inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po premytí doštičky bol pridaný do jamiiek streptavidín riedený v pomere 1: 1000 v riediacom roztoku (TBS) po 50  $\mu\text{l}$  na jamku a doštička bola inkubovaná 20 minút pri laboratórnej teplote na tmavom mieste. Po poslednom premytí doštičky, bol pridaný vyvolávací roztok (substrát) po 50  $\mu\text{l}$  na jamku a nechal sa inkubovať približne 5-10 minút. Reakcia bola zastavená 50  $\mu\text{l}$ /jamku 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Výsledok bol zmeraný spektrofotometricky.



Tab. 8: Riedenia vzoriek použité pri ELISA

Vzorky	riedenie
mDC po 24 hod	dvakrát
mDC z kokultivácií	neriedené
pDC z kokultivácií	neriedené

## 4 CIELE PRÁCE

- Charakterizácia vplyvu *E. coli* O83:K24:H31 na maturáciu mDC/pDC novorodencov zdravých a alergických matiek;
- porovnanie produkcie cytokínov po stimulácii *E. coli* O83 u mDC novorodencov zdravých a alergických matiek;
- rozdiel v indukcii subpopulácií (Th1, Th2, Th17 a Treg) po kokultivácii naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov s mDC/pDC stimulovaných *E. coli* O83 novorodencov zdravých a alergických matiek.

## 5 VÝSLEDKY

V rámci vypracovania tejto práce boli do štúdie zahrnuté zdravé a alergické matky bez vážnejších komplikácií počas tehotenstva, ktoré porodili cisárskym rezom alebo prirodzenou cestou v riadnom termíne v „Ústavu péče o matku a dieťa“ v Prahe od októbra 2015 do apríla 2017 po podpísaní písomného súhlasu. Štúdiu tvorili matky prevažne z Prahy či jej okolitých miest. Vek sa medzi nealergickými (Z) a alergickými (A) matkami významne neodlišoval (Z:  $31,5 \pm 5$  rokov; A:  $31,8 \pm 4,3$  rokov). Medzi faktory, ktoré môžu ovplyvniť reaktivitu CBMC, radíme dĺžku tehotenstva, ale aj fajčenie či stravovacie návyky, ktoré takisto nepreukázali významnú odlišnosť medzi skupinami. Alergia u matiek bola stanovovaná na klinickom prejave alergie pretrvávajúcom dlhšie ako 1 rok a matka bola sledovaná alergológom, mala pozitívne kožné testy (tzv. skin prick tests) alebo pozitívne špecifické protilátky IgE.

Pôsobenie probiotickej vakcíny *E. coli* O83 na indukciu maturácie a produkcie cytokínov u mDC bolo testované u detí zdravých matiek (deti s relatívne nízkym rizikom vývoja vzniku alergie) a detí alergických matiek (deti s pomerne vysokým rizikom vzniku alergie).

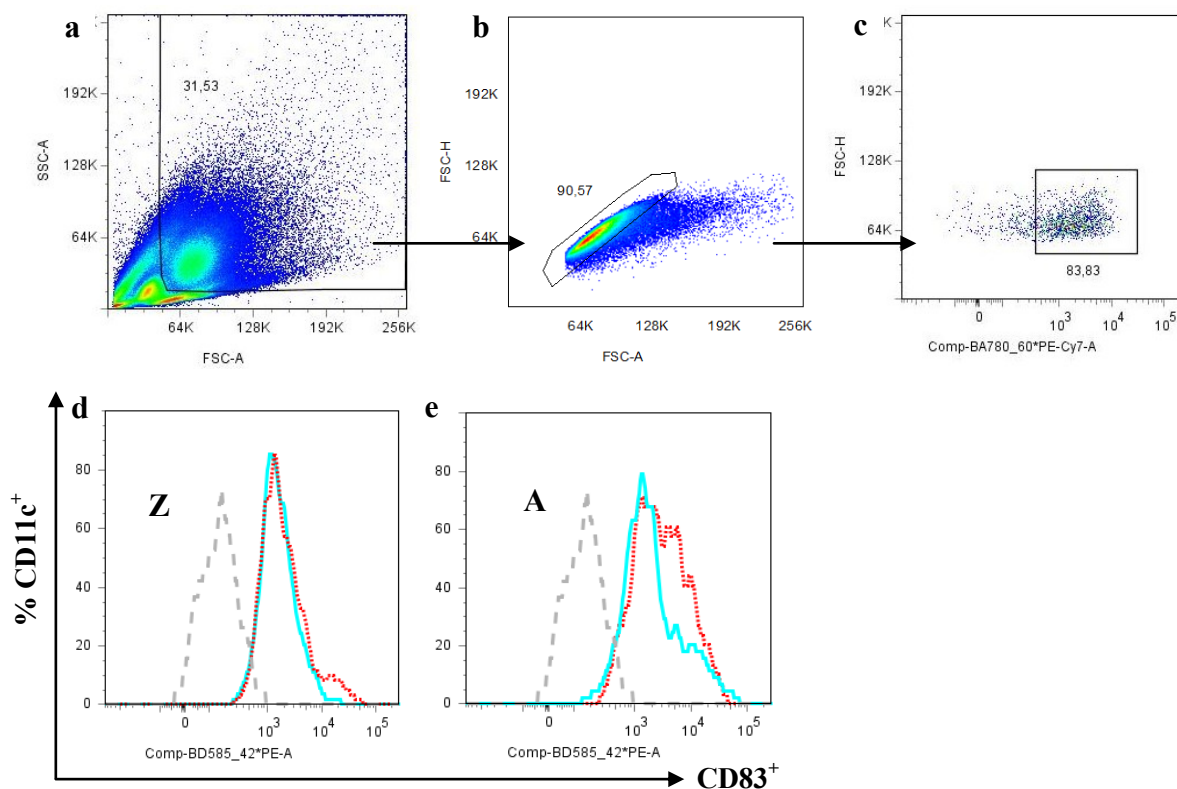
### 5.1 *E. coli* O83 zvyšuje percento CD83<sup>+</sup> mDC

Molekula CD83 je transmembránový glykoproteín, ktorý patrí k proteínom podobným imunoglobulínom (immunoglobulin-like proteins). CD83 je silne upregulovaná spoločne s kostimulačnými molekulami, ako sú CD80 a CD86 počas maturácie DC. To naznačuje, že hrá dôležitú úlohu pri indukcii imunitných odpovedí. V roku 1992 bola prvýkrát popísaná táto štruktúra a nazvaná HB-15 [210,211]. Neskôr bol tento názov zmenený na nami známu molekulu CD83. Je hlavným znakom zrelých DC a je tiež exprimovaný na aktivovaných B a T bunkách [212].

Účinok *E. coli* O83 na indukciu maturácie mDC bol testovaný u detí zdravých matiek (Z O83) a u detí matiek s alergiou (A O83) v porovnaní s nestimulovanými mDC (ZK a AK). Bol pozorovaný nárast CD83 pozitívnej populácie (CD83<sup>+</sup>) z populácie CD11c pozitívnych mDC (CD11c<sup>+</sup>) po stimulácii *E. coli* O83 u oboch skúmaných skupín. Signifikantne vyššia prítomnosť znaku CD83<sup>+</sup> na mDC po stimulácii *E. coli* O83 (Z O83 a A O83) bola detegovaná u detí zdravých ( $p = 0,0047$ ) a aj alergických matiek ( $p = 0,0097$ )

v porovnaní s nestimulovanou kontrolou (ZK, AK) (Obr. 11A). V rámci pozorovania bolo porovnávaných 44 detí, konkrétne 26 detí zdravých matiek a 18 detí alergických matiek. Analyzované vzorky boli merané na prietokovom cytometri a ďalej spracované programom FlowJo (gateovacia stratégia ukázaná na Obr. 9). Štatisticky boli vyhodnotené použitím t-testu a graficky prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru (Obr. 11). Rovnaký postup analýzy bol použitý aj u druhej skupiny DC – u pDC (Obr. 10), avšak s rozdielnymi protilátkami (použitá CD123<sup>+</sup>). U pDC bolo pozorovaných spolu 20 detí, a to 9 detí zdravých matiek s 11 deťmi alergických matiek.

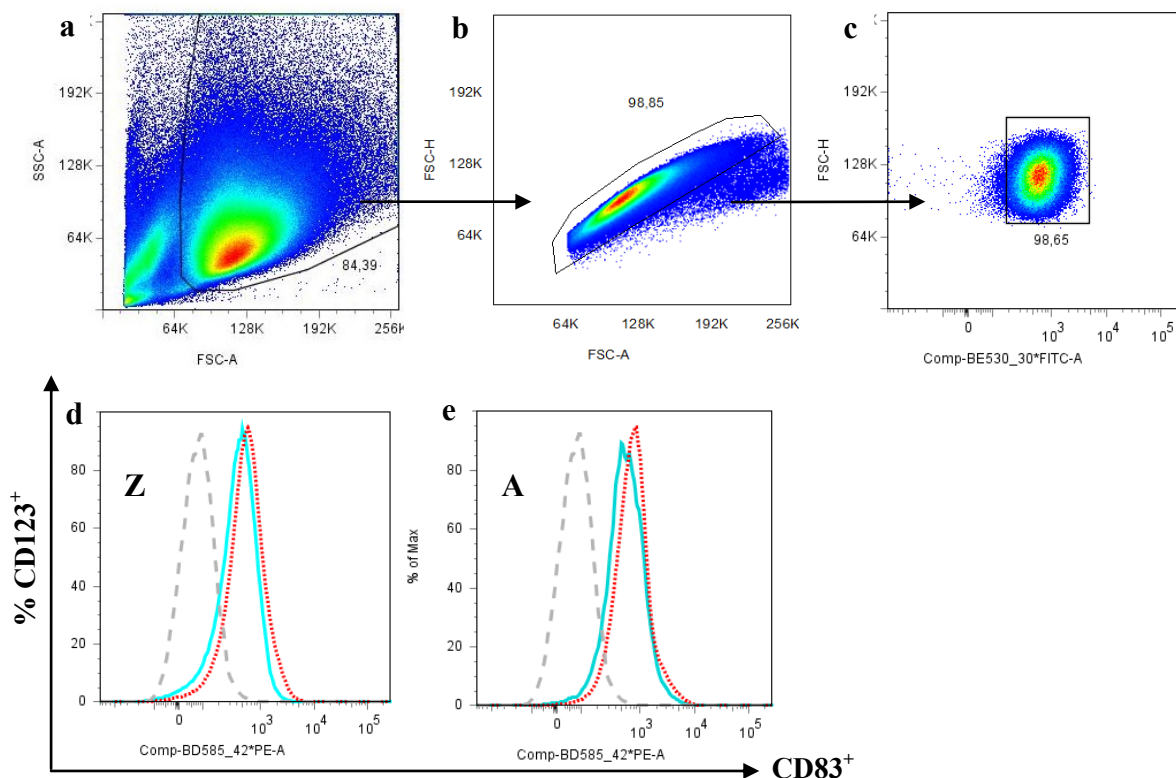
Cytometrická analýza u mDC zahrňovala gate pre celú populáciu buniek (Obr. 9a), z ktorých boli vylúčené doublety (Obr. 9b) a následne gate pre CD11c<sup>+</sup> populáciu mDC (obr. 9c). Na základe toho bola oddelená nami skúmaná skupina CD83<sup>+</sup> (PE) populácie z CD11c<sup>+</sup> (PE-Cy7) populácie buniek použitím FMO (Fluorescence-Minus-One) kontrol pre znak CD11c<sup>+</sup> u mDC. Rovnako ako u mDC, tak aj v prípade pDC bola použitá gateovacia stratégia oddeľujúca CD83<sup>+</sup> (PE) populáciu z CD123<sup>+</sup> (FITC) populácie buniek použitím FMO kontrol pre znak CD83<sup>+</sup> (Obr. 9a, b, c).



Obr. 9: Gateovacia stratégia mDC po 24 hod stimúlácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.

- Dot plot znázorňujúci všetky zmerané udalosti a výber (gate) bunkovej populácie podľa veľkosti (FSC) a komplexity (SSC);
  - vylúčenie doubletov (= výber singletov);
  - výber (gate) populácie buniek pozitívnych pre CD11c (znak v PE-Cy7);
  - reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na mDC detí zdravých matiek (Z);
  - reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na mDC detí alergických matiek (A).
- d), e) Z CD11c<sup>+</sup> buniek sú zobrazené histogramy porovnávajúce nestimulované mDC (modrá čiara) so vzorkami stimulovanými *E. coli* O83 (červená prerušovaná čiara) u detí zdravých (Z) a alergických (A) matiek a šedá prerušovaná čiara zobrazuje FMO kontrolu.

Bunky neznačené CD11c protilátkou sú zobrazené v Prílohe 2



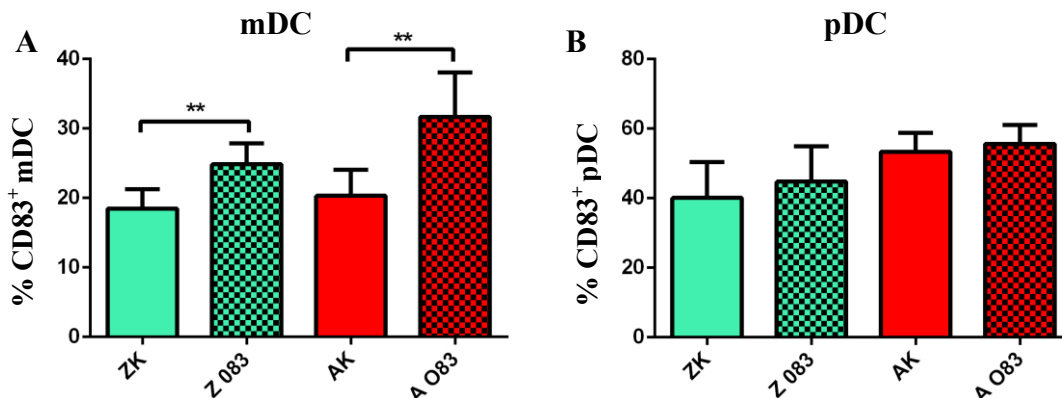
Obr. 10: Gateovacia stratégia pDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.

- a) Dot plot znázorňujúci všetky zmerané udalosti a výber (gate) bunkovej populácie podľa veľkosti (FSC) a komplexity (SSC);
  - b) vylúčenie doubletov (= výber singletov);
  - c) výber (gate) populácie buniek pozitívnych pre CD123 (znak vo FITC);
  - d) reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na pDC detí zdravých matiek (Z);
  - e) reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na pDC detí alergických matiek (A).
- d), e) Z CD123<sup>+</sup> buniek sú zobrazené histogramy porovnávajúce nestimulované pDC (modrá čiara) so vzorkami stimulovanými *E. coli* O83 (červená prerušovaná čiara) u detí zdravých (Z) a alergických (A) matiek a šedá prerušovaná čiara zobrazuje FMO kontrolu.

Bunky neznačené CD123 protilátkou sú zobrazené v Prílohe 2

## 5.2 Porovnanie mDC a pDC u skupín detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83

Vplyv stimulácie *E. coli* O83 na maturáciu mDC a pDC detí zdravých a alergických matiek. Na obrázku (Obr. 11) je možné vidieť, že percento CD83<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> mDC (Obr. 11A) signifikantne stúpa po stimulácii *E. coli* O83 u Z (ZK a ZO83;  $p = 0,0047$ ) ale aj A (AK a AO83;  $p = 0,0097$ ), pričom u A je toto navýšenie výraznejšie v porovnaní so Z, aj keď nie signifikantné. U nestimulovaných mDC nevidíme žiadne rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou. U pDC (Obr. 11B) neboli podobné rozdiely pozorované. Avšak je tu viditeľný posun u alergickej skupiny v porovnaní so zdravou, ako pri nestimulovaných, tak vzorkách stimulovaných.



Obr. 11: Porovnanie mDC a pDC detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 s nestimulovanou kontrolou.

A) Povrchová expresia znaku CD83 pozitívnych mDC kultivovaných bez a s *E. coli* O83; n = 44; Z(26) a A(18).

B) Povrchová expresia znaku CD83 pozitívnych pDC kultivovaných bez a s *E. coli* O83; n = 20; Z (9) a A (11).

Dáta boli štatisticky vyhodnotené použitím t-testu a graficky prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru.

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek (zelený stĺpec bez výplne);

Z O83 – mDC (ZK) stimulované *E. coli* O83 (zelený stĺpec s výplňou, textúrou);

AK – nestimulované mDC detí alergických matiek (červený stĺpec bez výplne);

A O83 – mDC (AK) stimulované *E. coli* O83 (červený stĺpec s výplňou, textúrou).

\*\*p ≤ 0.01

### 5.3 Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných *E. coli* O83 s naivnými CD4<sup>+</sup> T bunkami

Po stanovení vplyvu *E. coli* O83 na maturáciu mDC a pDC práca pokračovala študovaním vplyvu *E. coli* O83 stimulovaných DC na indukciu a polarizáciu rôznych populácií T-lymfocytov. Pre vyhodnotenie vplyvu stimulácie DC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu imunitnej odpovedi, boli použité dva panely sústreďujúce sa na rovnováhu medzi Th1 a Th2 imunitnej odpovede, respektívne medzi Th17 a Tregs.

Merané boli transkripčné faktory a cytokíny typické pre Th1 (T-bet, IFN- $\gamma$ ), Th2 (GATA3, IL-4, IL-13), Th17 (ROR $\gamma$ t, IL-17A, IL-22) a Treg (FoxP3, IL-10). Bolo analyzovaných 29 vzoriek u mDC kokultivovaných s CD4<sup>+</sup>, z toho 16 detí zdravých a 13 detí alergických matiek. V prípade kokultivácie CD4<sup>+</sup> s pDC bolo porovnaných 16 jedincov – 7 detí zdravých a 9 detí alergických matiek.

Bunky boli opäť zmerané na prietokovom cytometri a dáta spracované pomocou analyzačného softvéru FlowJo (Obr.12) a štatistického programu GraphPad Prism, ktorý nám umožnil graficky vizualizovať dosiahnuté výsledky (Obr. 13, 14). Následne boli dáta

štatisticky vyhodnotené použitím Mann-Whitney U testu a graficky prezentované s mediánom a smerodajnou odchýlkou.

### 5.3.1 Transkripčné faktory a cytokíny charakteristické pre dané subpopulácie

Cytometrická analýza u mDC, rovnako tak i u pDC bola jednotná. Zahrňovala gate pre celú populáciu buniek (Obr. 12Aa), z ktorej boli vylúčené doublety (Obr. 12Ab) a následne gate pre populáciu CD4 (APC-Cy7) pozitívnych buniek (Obr. 12Ac). Na základe toho bola oddelená populácia CD4<sup>+</sup> buniek, z ktorej sme následne zažetovali populácie buniek pre jednotlivé transkripčné faktory a príslušné cytokíny Th1/Th2 imunitnej odpovede (Obr. 12B), rovnako aj pre Th17/Treg imunitnej odpovede (Obr. 12C). Všetky cytokíny a transkripčné faktory boli gateované použitím FMO kontrol. Porovnanie negatívnej kontroly (čiže buniek neznačených CD4 protilátkou, transkripčnými faktormi či cytokínmi) a FMO je zobrazený v Prílohe 3.

#### CD4<sup>+</sup> lymfocyty kokultivované s mDC

Bolo pozorované zvýšené percentuálne zastúpenie transkripčného faktoru GATA3 charakteristického pre Th2 imunitnú odpoveď u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s kontrolnými mDC detí alergických matiek v porovnaní s deťmi zdravých matiek (GATA3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>; p = 0,0210) (Obr. 13a).

Graf poukazuje, že nestimulované mDC indukujú zvýšené percento GATA3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 T-lymfocytov, čo by mohlo poukazovať na vyššiu predominciu Th2 imunitnej odpovedi u detí s predispozíciou k rozvoju alergie (čiže deti alergických matiek) v porovnaní s deťmi zdravých matiek (Obr. 13a). Rovnako po kokultivácii mDC stimulovaných *E. coli* O83 bolo detegované vyššie zastúpenie GATA3 u A skupiny, ale namerané hodnoty nedosiahli štatistickej signifikancie.

U cytokínov charakteristických pre Th2 imunitnú odpoveď (IL-4, IL-13) nebol pozorovaný žiadny nárast v produkcii týchto cytokínov T-lymfocytmi, ktoré boli po kokultivácii ako s kontrolnými, tak probiotickým kmeňom stimulovanými mDC. Avšak je vidieť mierny nesignifikantný trend vyšších hodnôt IL-4 a IL-13 u A poukazujúcich na vyššiu schopnosť tvoriť cytokíny imunitnej odpovedi typu 2 bunkami pupečníkovej krvi detí alergických matiek v porovnaní so Z (Obr. 13b, c).



U charakteristického transkripčného faktora pre Th1 populáciu T-lymfocytov, T-bet, boli pozorované vyššie hodnoty tohto transkripčného faktora u mDC v rámci A skupiny bez ohľadu na stimuláciu *E. coli* O83 avšak bez signifikancie (Obr. 13d).

Je viditeľné veľmi mierne zvýšenie produkcie IFN- $\gamma$  u A skupiny v rámci mDC indukovaných T-lymfocytmi (Obr. 13e). Nebol však pozorovaný žiadny efekt stimulácie mDC *E. coli* O83 na rozdiel v indukcii ako Th1 imunitnej odpovede (T-bet, IFN- $\gamma$ ) tak Th2 (GATA3, IL-4, IL-13) imunitnej odpovede.

Pri hodnotení prítomnosti transkripčného faktora ROR $\gamma$ t, ktorý je charakteristický pre Th17 imunitnú odpoveď, bol zaznamenaný mierny vzostup expície ROR $\gamma$ t u T-lymfocytov kokultivovaných s mDC detí alergických matiek (Obr. 13f).

V rámci Th17 imunitnej odpovede boli merané cytokíny IL-17A a IL-22 u CD4. Výsledky poukazujú na to, že produkcia IL-17A T-lymfocytmi nie je ovplyvnená alergickým stavom matky (dieťaťa) a ani stimuláciou mDC probiotickou baktériou *E. coli* O83. U obidvoch skupín, Z aj A, sú zhodné výsledky (Obr. 13g). Naopak rozdiel bol pozorovaný v mierne zvýšenej produkcii IL-22 u CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov kokultivovaných ako s nestimulovanými tak stimulovanými mDC u detí alergických matiek oproti stimulovaným i nestimulovaným Z kontrolám. Rozdiel však nie je signifikantný (Obr. 13h). U FoxP3, transkripčného faktora charakterizujúceho T regulačné bunky (Treg) nebol pozorovaný žiadny rozdiel medzi Z a A skupinou a to ani po kokultivácii CD4 buniek s mDC stimulovanými *E. coli* O83 (Obr. 13i). Pri hodnotení prítomnosti cytokínu typického pre Treg (IL-10) si môžeme všimnúť, že sa signifikantne zvýšil percentuálny podiel IL-10<sup>+</sup> T-lymfocytov kultivovaných s mDC stimulovaných *E. coli* O83 u detí alergických matiek v porovnaní so stimulovanými mDC u Z skupiny (IL10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>,  $p = 0,0355$ ) (Obr. 13j).

### **CD4<sup>+</sup> lymfocyty kokultivované s pDC**

U pDC nie sú viditeľné žiadne signifikantné rozdiely medzi Z a A a to ako medzi stimulovanými tak nestimulovanými vzorkami (Obr. 14). U transkripčného faktora GATA3 charakteristického pre Th2 imunitnú odpoveď u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s kontrolnými pDC nebol zaznamenaný žiadny rozdiel medzi Z a A a to ani po kokultivácii pDC stimulovaných *E. coli* O83 (Obr. 14a).

U intracelulárneho cytokínu IL-4 charakteristického pre Th2 imunitnú odpoveď nebol pozorovaný žiadny nárast v produkcii T-lymfocytmi, ktoré boli kokultivované so

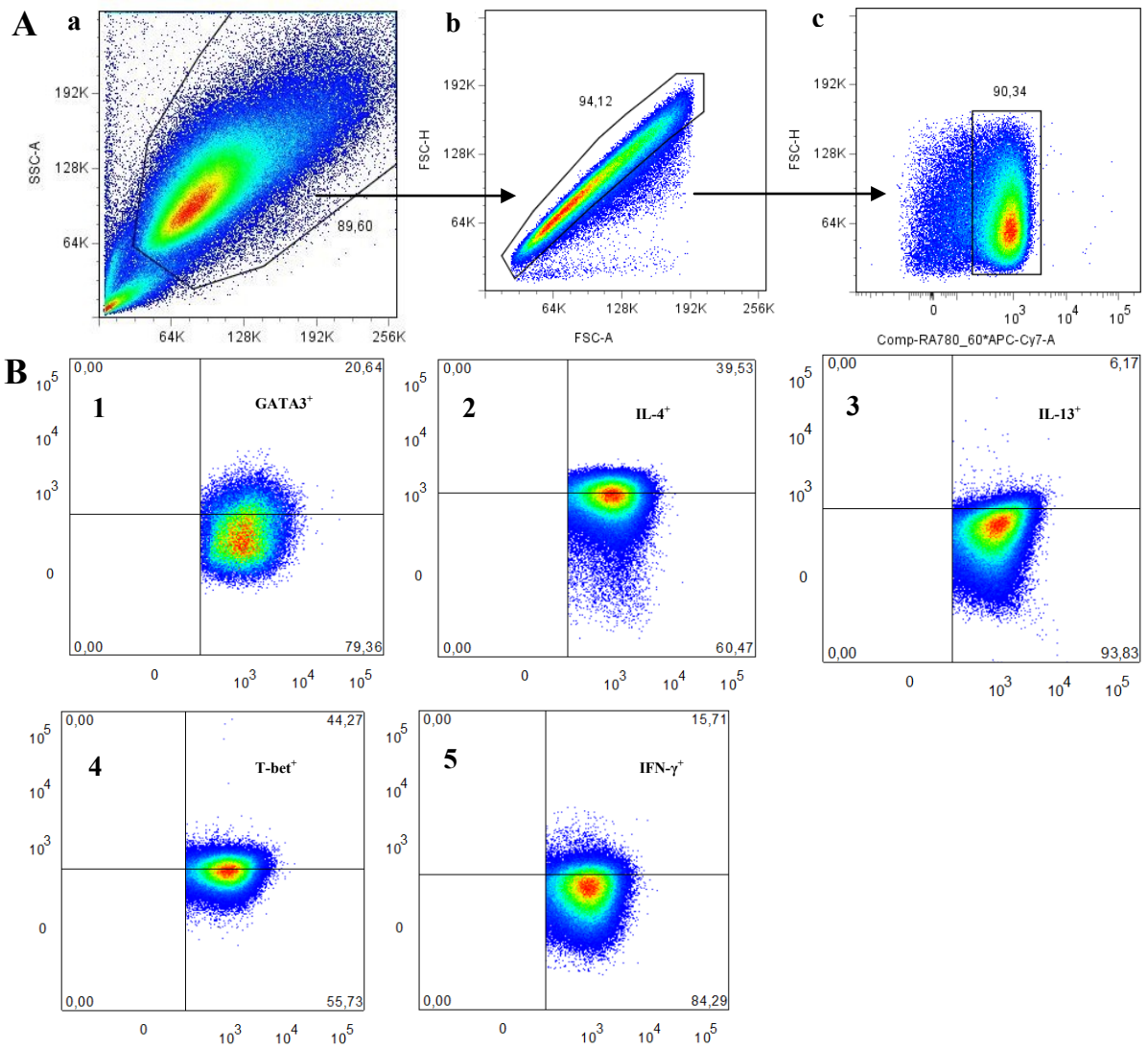
stimulovanými a nestimulovanými pDC Z aj A (Obr. 14b). Naopak pre druhý cytokín Th2 imunitnej odpovede, IL-13, bol signifikantne zvýšený v CD4<sup>+</sup> T bunkách kokultivovaných s nestimulovanými pDC Z porovnaním s A skupinou (IL-13<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, p = 0,0005). Zároveň bol pozorovaný signifikantný rozdiel v IL-13 u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC stimulovaných *E. coli* O83 medzi Z a A skupinou (IL-13<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, p = 0,0171) (Obr. 14c).

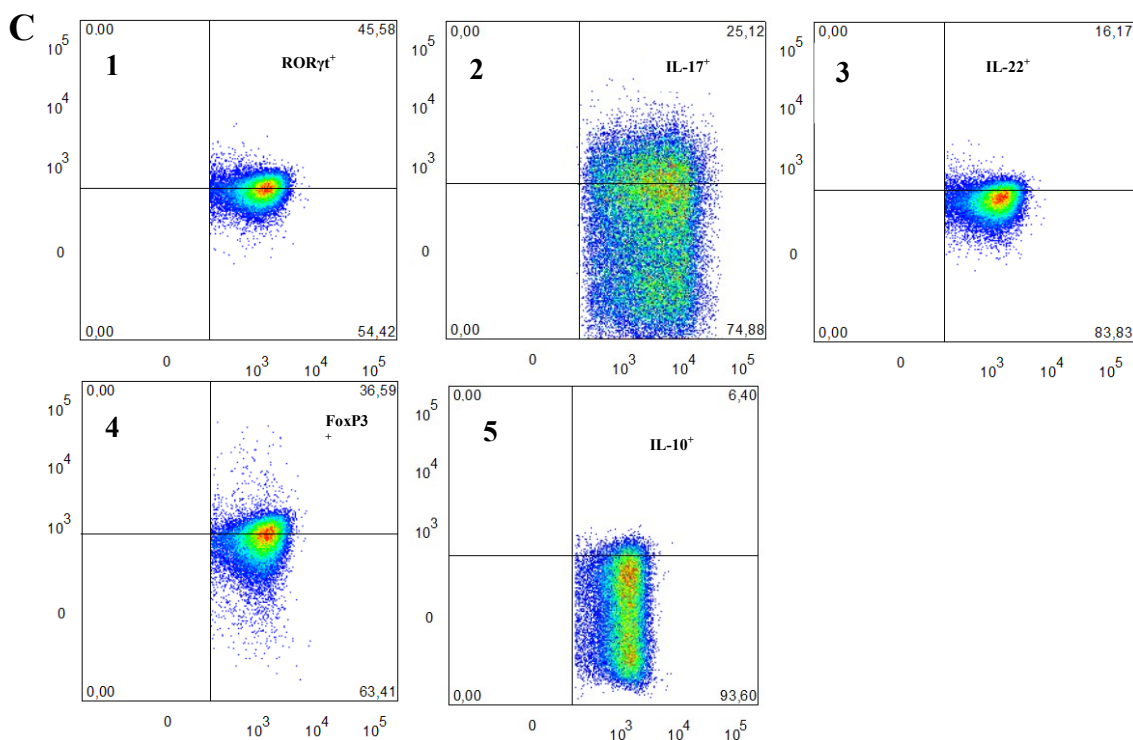
Nebol zaznamenaný žiadny efekt stimulácie pDC *E. coli* O83 na rozdiel v indukcii Th1 imunitnej odpovede (T-bet, IFN- $\gamma$ ) (Obr. 14d, e).

Pri hodnotení prítomnosti transkripčných faktorov u druhého panelu (Th17/Treg) sa nepozoroval žiadny rozdiel u ROR $\gamma$ t medzi Z a A skupinou a to ani po kokultivácii CD4 buniek s pDC stimulovanými *E. coli* O83 (Obr. 14f). Rovnaký prípad nastal aj u druhého transkripčného faktora FoxP3, kde nebol viditeľný rozdiel ani po kokultivácii CD4 buniek s pDC stimulovanými *E. coli* O83 na polarizáciu imunitnej odpovede u Z aj A (Obr. 14i).

Bol prítomný zvýšený trend produkcie IL-17A u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC u Z oproti A, hoci nebol signifikantný (Obr. 14g). Mierne zvýšená produkcia IL-22 je viditeľná u A porovnaním so Z, ale namerané hodnoty nedosiahli štatistickej signifikancie (Obr. 14h).

U IL-10, ako regulačného cytokínu bola zaznamenaná u CD4<sup>+</sup> signifikantne zvýšená produkcia po stimulácii *E. coli* O83 u Z oproti A (IL10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, p = 0,0384). V prípade CD4<sup>+</sup> kokultivovaných s kontrolnými pDC je opäť zvýšená produkcia tohto cytokínu u Z v porovnaní s A, avšak štatisticky nevýznamná (Obr. 14j).



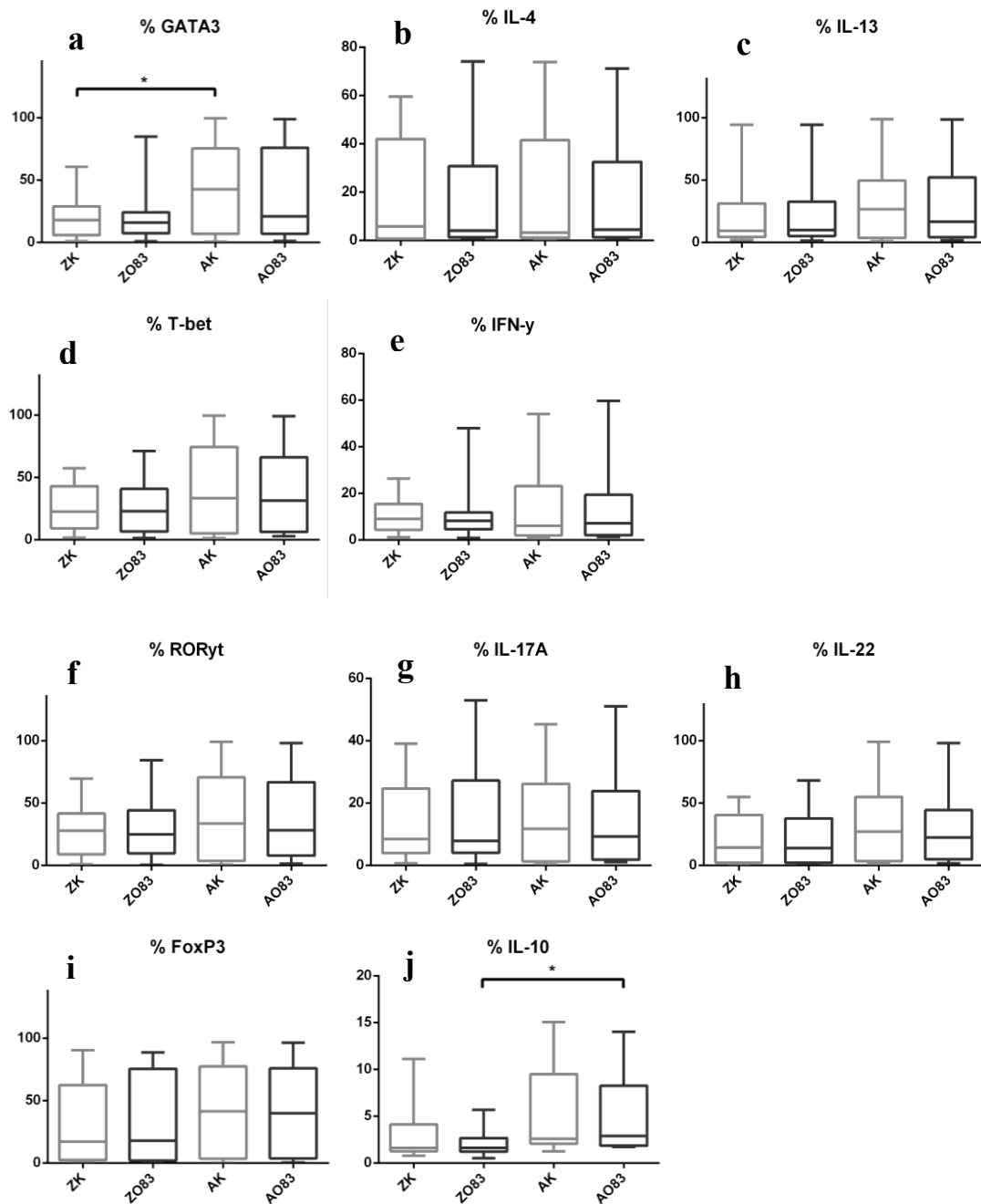


Obr. 12: Meranie transkripčných faktorov a cytokínov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie CD4<sup>+</sup> T lymfocytov kokultivovaných s mDC/pDC stimulovanými *E. coli* O83.

**A.** Na prvých troch obrázkoch je vidieť gateovaciu stratégiu použitú pre kokultivácie lymfocytov s mDC, rovnako aj u pDC. Najprv bola vybraná celá populácia buniek podľa veľkosti a komplexity (**Aa**), z nich singlety (**Ab**) a nakoniec populácia CD4 (APC-Cy7) pozitívnych buniek (**Ac**).

**B., C.** Populácie CD4 pozitívnych buniek pre jednotlivé transkripčné faktory a príslušné cytokíny Th1/Th2 imunitnej odpovede (**B**) rovnako aj u Th17/Treg imunitnej odpovede (**C**). V prípade subpopulácii buniek Th1/Th2 imunitnej odpovede (**B**) je vidieť, že CD4<sup>+</sup> a GATA3<sup>+</sup> (PE) populáciu tvorí 20,64% (**B1**); CD4<sup>+</sup> a IL-4<sup>+</sup> (PE-Cy7) populáciu tvorí 39,53% (**B2**); CD4<sup>+</sup> a IL-13<sup>+</sup> (APC) populáciu tvorí 6,17% (**B3**); CD4<sup>+</sup> a T-bet<sup>+</sup> (FITC) populáciu tvorí 44,27% (**B4**); CD4<sup>+</sup> a IFN-γ<sup>+</sup> (PerCP-Cy5.5) populáciu tvorí 15,71% (**B5**). V prípade subpopulácii buniek Th17/Treg imunitnej odpovede (**C**) je vidieť, že CD4<sup>+</sup> a RORγt<sup>+</sup> (FITC) populáciu tvorí 45,58% (**C1**); CD4<sup>+</sup> a IL-17<sup>+</sup> (PerCP-Cy5.5) populáciu tvorí 25,12% (**C2**); CD4<sup>+</sup> a IL-22<sup>+</sup> (PE) populáciu mDC tvorí 16,17% (**C3**); CD4<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup> (APC) populáciu tvorí 36,59% (**C4**); CD4<sup>+</sup> a IL-10<sup>+</sup> (PE-Cy7) populáciu tvorí 6,40% (**C5**).

Porovnanie negatívnej kontroly, čiže buniek neznačených CD4 protilátkou a FMO je zobrazený v Prílohe 3.



Obr. 13: Vplyv stimulácie mDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie. Nestimulované a stimulované mDC boli kultivované s naivnými CD4<sup>+</sup> bunkami, ku ktorým boli pridané CD3 a CD28, protilátky na stimuláciu. Následne bol k bunkám pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a detegovaná prítomnosť transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov prietokovým cytometrom.

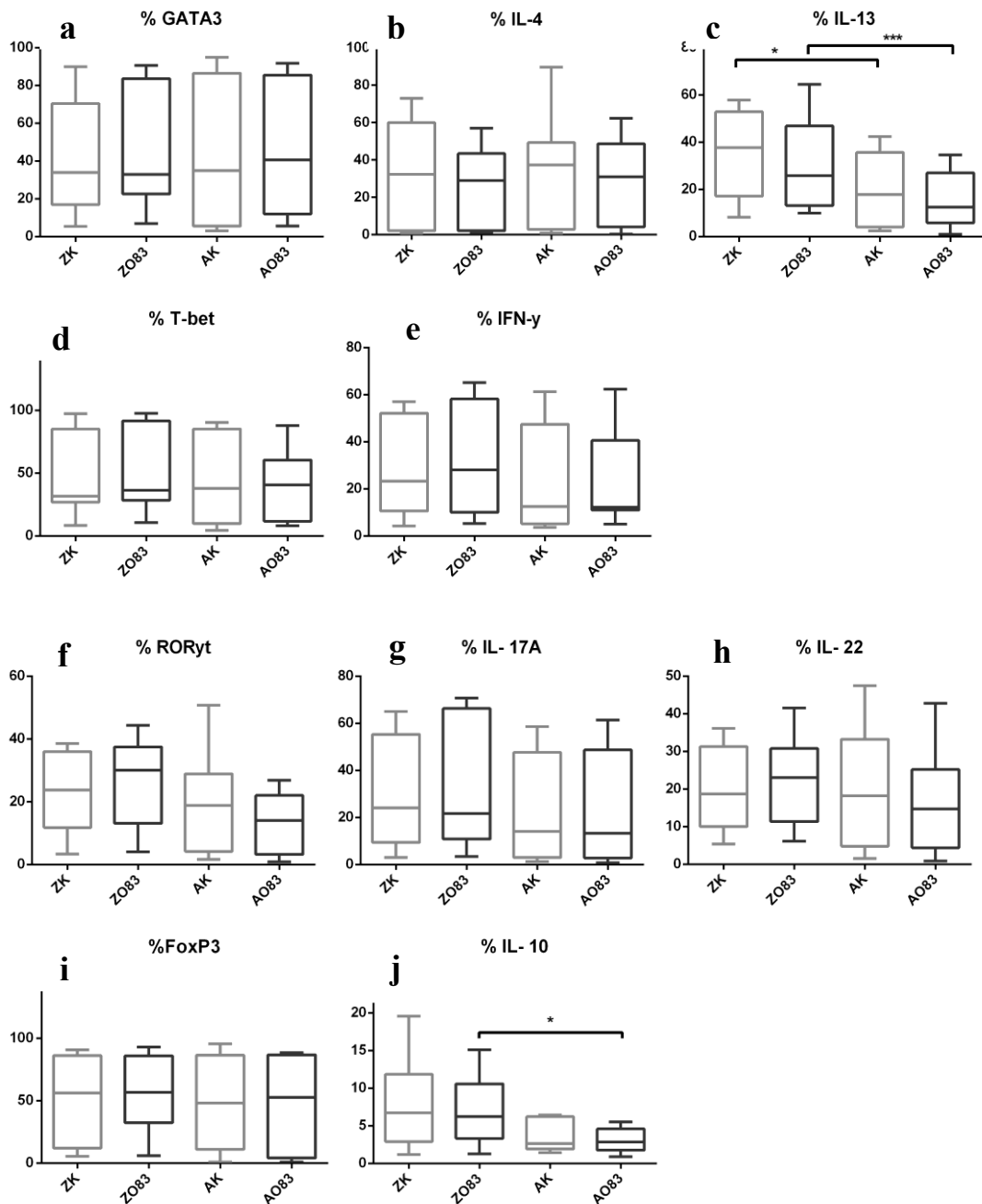
Získané výsledky sú prezentované formou krabicových diagramov s mediánom a smerodajnou odchýlkou. Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou Mann-Whitney U testu.

**a)** Percento GATA3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **b)** Percento IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **c)** Percento IL-13<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **d)** Percento Tbet<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th1 buniek; **e)** Percento IFN-γ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th1 buniek; **f)** Percento RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **g)** Percento IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **h)** Percento IL-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **i)** Percento FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg buniek; **j)** Percento IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg.

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek kokultivovaných s CD4<sup>+</sup>; Z O83 – *E. coli* O83 stimulované mDC detí zdravých matiek kokultivované s CD4<sup>+</sup>; AK – nestimulované mDC detí alergických matiek

kokultivované s CD4<sup>+</sup>; A O83 – *E. coli* O83 stimulované mDC detí alergických matiek kokultivované s CD4<sup>+</sup>.

\*p ≤ 0,05



Obr. 14: Vplyv stimulácie pDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie. Nestimulované a stimulované pDC boli kultivované s naivnými CD4<sup>+</sup> bunkami, ku ktorým boli pridané CD3 a CD28, protilátky na stimuláciu. Následne bol k bunkám pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a detegovaná prítomnosť transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov prietokovým cytometrom.

Získané výsledky sú prezentované formou krabicových diagramov s mediánom a smerodajnou odchýlkou. Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou Mann-Whitney U testu.

**a)** Percento GATA3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **b)** Percento IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **c)** Percento IL-13<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 buniek; **d)** Percento Tbet<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th1 buniek; **e)** Percento IFN-γ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th1 buniek; **f)** Percento RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **g)** Percento IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **h)** Percento IL-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 buniek; **i)** Percento FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg buniek; **j)** Percento IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg buniek po kokultivácii pDC.

ZK – nestimulované pDC detí zdravých matiek kokultivovaných s CD4<sup>+</sup>; Z O83 – *E. coli* O83 stimulované pDC detí zdravých matiek kokultivované s CD4<sup>+</sup>; AK – nestimulované pDC detí alergických matiek kokultivované s CD4<sup>+</sup>; A O83 – *E. coli* O83 stimulované pDC detí alergických matiek kokultivované s CD4<sup>+</sup>.

\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

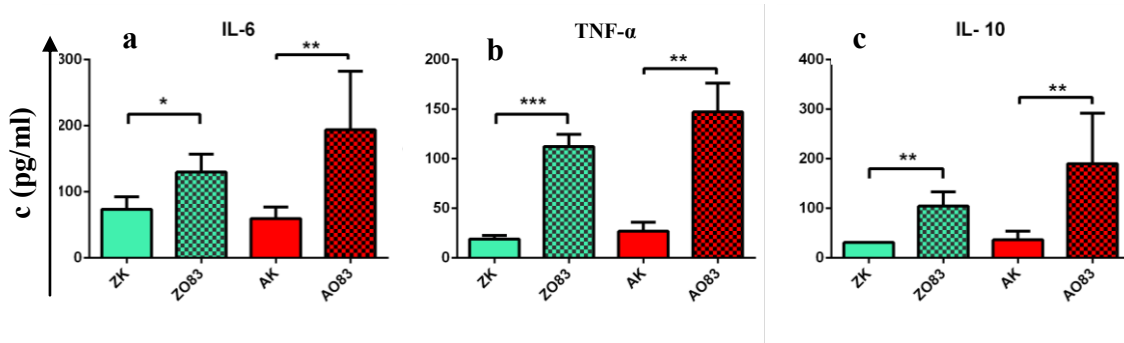
#### 5.4 Stimulácia probiotickým kmeňom *E. coli* O83 zvyšuje produkciu cytokínov v supernatante kultúr mDC

Pre hodnotenie produkcie cytokínov (TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-10) u subpopulácie mDC bolo metódou ELISA detegované ich množstvo v supernatante kultúr po 24 hodinovej kultivácii s *E. coli* O83. V supernatante sa stanovila prítomnosť cytokínov vo vzorkách nestimulovaných a stimulovaných kmeňom *E. coli* O83. U mDC bola detegovaná prítomnosť prozápalových IL-6, TNF- $\alpha$  a protizápalového cytokínu IL-10. Stimulácia *E. coli* O83 spôsobila signifikantný nárast produkcie všetkých spomínaných cytokínov u mDC detí Z aj A matiek. Produkcia týchto cytokínov bola vyššia po stimulácii *E. coli* O83 u subpopulácie mDC alergických matiek, aj keď štatisticky nesignifikantná.

Prítomnosť IL-6 bola signifikantne zvýšená porovnaním Z ale aj A skupiny po stimulácii mDC *E. coli* O83 s nestimulovanou kontrolou. Z grafu vidíme, že po stimulácii *E. coli* O83 ako u Z (ZK a ZO83;  $p = 0,0396$ ) tak u A skupiny (AK a AO83;  $p = 0,0049$ ) bola detegovaná produkcia IL-6 v mDC ako signifikantná (Obr. 15a). Schopnosť *E. coli* O83 indukovať tvorbu TNF- $\alpha$  bola podobná ako v prípade IL-6. U Z jedincov vidíme výrazný signifikantný rozdiel v produkcii TNF- $\alpha$  medzi kontrolnými a stimulovanými mDC (ZK a ZO83;  $p = 0,0002$ ). K ešte väčšej produkcii po stimulácii *E. coli* O83 došlo porovnaním A jedincov (AK a AO83;  $p = 0,0079$ ) (Obr. 15b). Hoci opäť možno pozorovať trend vyšších hodnôt IL-6 u mDC stimulovaných *E. coli* O83 A skupiny, nie je toto zvýšenie štatisticky významné v porovnaní s mDC Z. U posledného analyzovaného cytokínu, protizápalového IL-10, vidíme signifikantne vyššiu produkciu daného cytokínu po stimulácii *E. coli* O83 u Z jedincov porovnaním kontroly a stimulovanej vzorky (ZK a ZO83;  $p = 0,0024$ ). Rovnaký trend bol pozorovaný aj u druhej, A skupiny (AK a AO83;  $p = 0,0013$ ) hoci s vyššou reaktivitou po stimulácii *E. coli* O83 (Obr. 15c). Namerané dáta boli štatisticky vyhodnotené použitím t-testu a údaje sú prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru (Obr. 15).

U supernatantu z kokultivácií DC s CD4<sup>+</sup> T-lymfocytmi bola časť výsledkov merania cytokínov pomocou metódy ELISA pod detekčným limitom, a preto nebolo

možné tieto cytokíny štatisticky vyhodnotiť. Jednalo sa o cytokíny IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-22 a IFN- $\gamma$ .



Obr. 15: **Produkcia cytokínov dendritickými bunkami u detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 v porovnaní s kontrolou.**

Získané výsledky sú prezentované formou stĺpcových diagramov s priemerom a strednou chybou priemeru. Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou t-testu.

- a) Sekrécia IL-6 u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 13; Z (8) a A (5);
- b) Sekrécia expresia TNF- $\alpha$  u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 13 Z (8) a A (5);
- c) Sekrécia IL-10 u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 27; Z (16) a A (11).

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek; Z O83 – stimulované mDC *E. coli* O83 detí zdravých matiek; AK – nestimulované mDC detí alergických matiek; A O83 – stimulované mDC *E. coli* O83 detí alergických matiek; c – koncentrácia v pg/ml.

\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$



## 6 DISKUSIA

Stimulácia probiotickým kmeňom *E. coli* O83 podporovala indukciu maturácie mDC a rovnako tak pDC detí zdravých a alergických matiek. Táto stimulácia bola vyššia u alergickej skupiny v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vplyv *E. coli* O83 na indukciu maturácie bol výraznejší u CD83<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> mDC a to dokonca signifikantne oproti CD83<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> pDC, kde pozorujeme iba trend. Stimulácia probiotickými bakteriálnymi kmeňmi pozitívne ovplyvňuje aktivitu imunitného systému a znižuje riziko rozvoja alergií na základe podpory vyzrievania Th1 imunitnej odpovede [213].

Z vyššie uvedených dôvodov sa ako vhodná probiotická vakcína javí použitie kmeňa *E. coli* O83, ktorý vykazuje pozitívne účinky na maturáciu imunitného systému novorodencov *in vitro* [40,214].

V niektorých klinických štúdiách boli použité aj iné probiotické kmene (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) s pozitívnym výsledkom pri podávaní prenatálne aj postnatálne [215]. Nejednotnosť výsledkov prítomných v použitej literatúre môže byť spôsobená použitím rôznych probiotických kmeňov v iných časových obdobiach, rovnako tak aj nejednotnosť skúmaných parametrov a vyšetrovacích metód. V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na probiotický kmeň *E. coli* O83 a mechanizmus jeho účinku, čím nadväzujeme na štúdie Lodinovej-Žádnikovej, ktorá má pozitívne výsledky s použitím tohto kmeňa.

Analýza transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov charakteristických pre rôzne subpopulácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov indukovaných DC spočívala v porovnaní miery expresie týchto pôsobkov (**Th1** – T-bet, IFN- $\gamma$ ; **Th2** – GATA3, IL-4, IL-13; **Th17** – ROR $\gamma$ t, IL-17A, IL-22; **Treg** – FoxP3, IL-10). Pri analýze Th1 a Th2 subpopulácií CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov indukovaných mDC sme našli významný rozdiel v expresii transkripčného faktora GATA3<sup>+</sup> medzi Z a A skupinou. V produkcii cytokínov IL-4, IL-13 a IFN- $\gamma$  sme však rozdiel nepozorovali. U populácie Th17 a Treg je mierne zvýšená produkcia transkripčného faktora ROR $\gamma$ t, IL-22 a IL-10 u skupiny A oproti Z kontrolám. Naopak produkcia FoxP3 a IL-17A sa u jednotlivých skupín Z a A nelíši.

U subpopulácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov indukovaných pDC je viditeľný signifikantný rozdiel v produkcii IL-13, naopak u cytokínov a transkripčných faktorov (GATA3<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup> a IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) nie sú patrné rozdiely medzi Z kontrolami a skupinou A. U subpopulácií

Th17 a Treg sa v rámci pDC zistilo signifikantné zníženie IL-10 a mierne zníženie produkcie IL-17A u skupiny A oproti Z. Transkripčné faktory ROR $\gamma$ t, FoxP3 a cytokín IL-22 sa u jednotlivých skupín nelíši.

### ***E. coli* O83 zvyšuje percento CD83<sup>+</sup> mDC**

Ako u mDC tak u pDC je vidieť, že dochádza k zvýšeniu CD83<sup>+</sup> (u mDC k signifikantnému) u A skupiny po stimulácii *E. coli* O83 (Obr. 8 Z a A; Obr. 9 Z a A) čo koreluje s výsledkami práce Súkeníkovej *et al.*, ktorá sa venovala populácii mDC generovaných *in vitro* z prekursorových buniek pupočníkovej krvi [216]. V jej práci bola rovnako ako v tejto práci spracovávaná pupočníková krv a použitý rovnaký probiotický kmeň *E. coli* O83. Po stimulácii *E. coli* O83 dochádza u A jedincov oproti Z k výraznejšej aktivácii stimulovaných buniek. Stúpa marker DC CD83<sup>+</sup>, čo značí zrelšie DC a tým zlepšenie imunitnej reakcie.

Dendritické bunky majú široké uplatnenie, predovšetkým patria medzi najdôležitejšie APC, takisto určujú imunitné reakcie na široké spektrum antigénov vrátane alergénov a mikrobiálnych stimulov. Podľa zistení Jiaoa *et al.* je pre DC zaujímavý práve vplyv probiotík na DC v kontexte s alergénmi a mikrobiálnymi stimulmi a to tým, že expozícia novorodenca mikrobiálnymi zložkami je inhibičná pre vývoj alergických reakcií v dospelosti; ďalej to vedie k zmenám vo fenotype a funkcii DC v dospelosti [217]. Dôležité je spomenúť, že ich výskum prebiehal na myšiach, kde im išlo o skúmanie účinku alergických reakcií po vystavení novorodených myší usmrtenou baktériou *Chlamydia muridarum* (pôvodne nazývanou *Chlamydia trachomatis*) krátko po ich narodení (5.-6. deň). V dospelosti, čo bolo 35 dní po ich narodení, boli tieto myši senzibilizované OVA (Ovalbumin) podľa protokolu. Po uplynutí 7 dní po senzibilizácii boli myši usmrtené, pričom následne bola testovaná ich alergická reakcia a imunitná odpoveď. Diplomová práca porovnávala rovnako vplyv expozície probiotickej baktérie na procesy zúčastňujúce sa v rozvoji alergickej reakcie, nie však na myšiach, ako vo vyššie spomenutej práci, ale s použitím pupočníkovej krvi detí zdravých a alergických matiek.

Ako marker poukazujúci na indukciu maturácie DC bol použitý CD83, pretože najviac reagoval na stimuláciu a zohráva kľúčovú úlohu u DC v primárnej imunitnej odpovedi [109,212]. V predchádzajúcej kapitole výsledky (viz kap. 5) bola popísaná zvýšená prítomnosť daného aktivačného markera na mDC po stimulácii *E. coli* O83; mierne zvýšená bola aj u pDC, avšak nesignifikantne. Detekcia zvýšenej prítomnosti CD83

na mDC detí alergických matiek v porovnaní so zdravými, je v súlade s predchádzajúcimi pozorovaniami zvýšenej reaktivity CBMC u Žížky *et al.* [218] a génovou expresiou u mDC podľa Hrdého *et al.* [219]. Práca Hrdého skúmala pôsobenie *in vitro* za použitia moDC (Monocyte Derived Dendritic Cells) detí zdravých a alergických matiek, avšak k stimulácii používala nie *E. coli* O83, ale LPS. V rámci tejto diplomovej práce nebolo LPS použité ako ďalší stimulans kvôli nedostatočnému počtu buniek z pupočníkovej krvi. V ich prípade bola použitá väčšia skupina jedincov, a to viac ako 50 z oboch pozorovaných skupín. Dáta sú porovnateľné, pretože rovnako ako v tejto práci boli merané metódou prietokovej cytometrie, za použitia rovnakých médií a protilátok.

### **Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných *E. coli* O83 s naivnými CD4<sup>+</sup> T bunkami**

#### **Transkripčné faktory**

Ako je uvedené v predošlej kapitole (viz kap. 5.3), jedná sa o analyzovanie vplyvu DC stimulovaných *E. coli* O83 na indukciu imunitných odpovedí -> Th1, Th2, Th17 a Treg.

V rámci Th1 odpovede bol pre transkripčný faktor T-bet u mDC pozorovaný mierny nárast u A skupiny v porovnaní so Z jedincami, či už po stimulácii *E. coli* O83 alebo bez stimulácie, avšak bez signifikancie. Naopak u CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov kokultivovaných s pDC neboli pozorované rozdiely medzi Z a A skupinou, a to ani po stimulácii *E. coli* O83. Signifikantne vyššiu expresiu T-bet u Z jedincov popísali v práci Vale-Pereira *et al.*, kde u alergických jedincov (astmatikov) bola jeho expresia nízka [220]. Naopak mierne zvýšenú expresiu tohto transkripčného faktora u A popisuje práca Súkeníkovej *et al.* [216] tak isto nesignifikantne, ako tomu bolo aj v prípade diplomovej práce. Práca Vale-Pereira pracovala s kohortou 32 astmatikov, ktorý boli porovnávaní so 17 zdravými jedincami. Týmto pacientom bola odobraná periférna krv, ktorú izolovali a stimulovali *in vitro* s CD3 a CD28 s nasledovanou izoláciou mRNA.

Pre transkripčné faktory charakteristické pre Th17/Treg nebol pozorovaný rozdiel u FoxP3 medzi Z a A skupinou a ani po stimulácii *E. coli* O83 k žiadnej zmene nedošlo. Iné výsledky docielili v práci Vale-Pereira *et al.* [220], ktorý pozoroval expresiu transkripčného faktora FoxP3 nie v pupočníkovej, ale v periférnej krvi. Podobne ako v tejto práci, kde sme sledovali zdravých jedincov s alergickými, v ich práci sa zamerali na astmatikov, ktorých porovnávali so zdravými kontrolami. Zistili, že FoxP3 je signifikantne

zvýšený u zdravých jedincov v porovnaní s astmatikmi. Zistenia platili pre DC všeobecne. Pre transkripčný faktor Th17 imunitnej odpovede – ROR $\gamma$ t – bol pozorovaný mierny vzostup expresie u mDC, avšak nie pDC. Nami dosiahnuté výsledky sú porovnateľné s prácou Súkeníkovej *et al.* [216]. Medzi obidvoma prácami bol pozorovaný rozdiel prítomný v expresii FoxP3. Súkeníkova *et al.* publikuje nesignifikantne zvýšené percento indukovaných FoxP3<sup>+</sup> Tregov u detí alergických matiek, pričom táto diplomová práca popisuje výsledky bez značného rozdielu v rámci skupín, tiež nesignifikantne. Ako už bolo uvedené vyššie, pri jej práci bol použitý rovnaký materiál, a to pupočníková krv. Rozdiel bol však v stimulácii buniek, ktoré boli v jej prípade generované *in vitro* z prekursoru. Diplomová práca popisuje mDC izolované priamo z krvi.

### Cytokíny

Stanovovali sa cytokíny charakteristické pre jednotlivé imunitné odpovede. U IL-4 a IL-13, cytokínov typických pre Th2 odpoveď, u mDC nebol pozorovaný žiadny nárast. Avšak mierne zvýšená reaktivita u detí A matiek ostáva zachovaná, čo je v súlade s prácou Olssonovej *et al.* [221]. Jej práca bola vykonávaná nie s pupočníkovou, ale s periférnou krvou u pacientov s alergiou, pričom kontrolu tvorila kohorta 5 pacientov bez alergie. Zbierali supernatant po 5 dňovej stimulácii alergénom, kde detegovali hladinu cytokínov. U cytokínu IL-13 nepozorovali žiadny nárast po stimulácii alergénom a rovnaká situácia bola zaznamenaná aj v našom prípade. Rovnako tak bolo pozorované signifikantné zvýšenie produkcie IL-13 u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC u zdravých detí v porovnaní s alergickou skupinou. Keďže v ich práci tvorilo kontrolnú skupinu len 5 zdravých jedincov, výsledky nie sú dostatočne validné. Tulic *et al.* [222] vo svojej práci porovnával DC všeobecne v rámci Z a A detí. Ich výsledky poukazujú, že IL-13 bol signifikantne vyšší v rámci A skupiny, čo sa nezhoduje s výsledkom uvedeným v tejto práci. Rovnako tak práca Hrdého *et al.* [223] popisuje zvýšenie IL-13 u detí alergických matiek v porovnaní so zdravými matkami. Jednalo sa o signifikantné zvýšenie, avšak až po stimulácii PHA (Phytohemaglutinine) u A jedincov v porovnaní s jej kontrolou. V diplomovej práci bol použitý jediný stimulans, a to *E. coli* O83, čiže to, ako by sa bunky chovali po stimulácii s PHA nevieme posúdiť z dôvodu nedostatočného počtu buniek. V práci Hrdého bola ďalej pozorovaná signifikancia po stimulácii PHA kokultivovanými s kolostrom u alergikov v porovnaní so zdravou kontrolou rovnako po stimulácii PHA a kokultivácii s kolostrom. V ich práci sa používal rovnaký biologický materiál, a to CBMC

detí zdravých a alergických matiek, ktorú kultivovali s kolostrom a stimulovali PHA. Vzhľadom na použitie silnejšieho stimulantu a odlišnej kokultivácie, nie sú tieto výsledky úplne porovnateľné s tými, ktoré sú uvedené v diplomovej práci.

U druhého cytokínu, ktorý je hlavným determinujúcim faktorom pre vývoj Th2 imunitnej odpovede, IL-4, nebol zistený žiadny rozdiel ani u mDC ani pDC pre Z a A skupinu či už stimulovanú *E. coli* O83 alebo nestimulovanú. Naopak Prescott *et al.* [224] ako aj Hrdý *et al.* [225] popísali v svojich prácach signifikantne nižšiu produkciu IL-4 u alergickej skupiny. V tejto práci bola detegovaná vyššia produkcia IL-4 u A skupiny. Prescott *et al.* vo svojej práci detegoval hladinu cytokínov z mononukleárných buniek pomocou qRT-PCR (quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) a ich výsledok detekcie IL-4 bol signifikantne nižší u detí alergických matiek v porovnaní so zdravými, avšak v diplomovej práci bol zistený rozdiel nesignifikantný pravdepodobne s ohľadom na rozdielnosť metodík v oboch prácach. Rovnako tak aj Hrdý vo svojej práci detegoval cytokíny pomocou qRT-PCR z mRNA a cytokínovej koncentrácii v sére získané z pupočníkovej krvi detí zdravých a alergických matiek. Génová expresia IL-4 v CBMC detí zdravých matiek bola signifikantne zvýšená v porovnaní s alergickou skupinou. ELISA testom testovali skupinu viac ako 50 jedincov. Mierne zvýšenie IL-4 u A skupiny zistené metódou qRT-PCR, nebolo signifikantné v porovnaní so zdravou kontrolou v rámci. Porovnávaných bolo 10 jedincov u oboch skupín. Výsledky našich meraní nie sú presne porovnateľné s génovou expresiou, pretože odrážajú produkciu cytokínov rôznymi bunkami a tkanivami.

IFN- $\gamma$  je typickým zástupcom Th1 imunitnej odpovede a dôležitým cytokínom s antivírusovým účinkom. U CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s mDC aj pDC neboli pozorované rozdiely medzi Z a A skupinou. Pozorujeme iba mierne zvýšenú expresiu tohto cytokínu u mDC pre alergickú skupinu. Práce Contrerasa *et al.* [136] a Prescottovej *et al.* [213] popisujú rovnako tak ako diplomová práca nízku expresiu IFN- $\gamma$  u skupiny A stimulovanej i nestimulovanej. Oba výskumy prebiehali na novorodencoch s odlišnou kohortou detí alergických rodičov. Do štúdie Contreasa *et al.* bolo vybraných 112 detí, ktorým bola odobraná periférna krv a následne stimulovaná PHA alebo bežnými alergénmi (prach, mačka). V supernatante po stimulácii alergénom detekovali hladinu cytokínov po 24 a 60 hodinách, v prípade IFN- $\gamma$  po 60 hodinách. Kohortu 60 detí sledovali v práci Prescottovej *et al.* do veku 6 rokov. Práca Farkasa *et al.* popisuje mierne zvýšenú produkciu IFN- $\gamma$  po stimulácii alergénom u DC všeobecne, avšak vyššia produkcia bola prítomná u pDC, než u mDC, čo koreluje s dátami uvedenými v tejto práci [226].

Zaujímavé zistenie nám ponúka práca Danisa *et al.*, ktorá popisuje nie len hladinu IFN- $\gamma$  v CBMC, ale porovnáva ju aj s hladinou tohto cytokínu u dospelých jedincov [227]. V jeho práci bolo porovnávaných 14 novorodencov s rovnako veľkou kohortou dospelých jedincov, kde zistili, že hladina tohto dôležitého cytokínu je u novorodencov veľmi nízka, v podstate priam nulová. Toto zistenie porovnávali aj ELISA testom a výsledky boli totožné, avšak iba so 6 vzorkami.

Zvýšená hladina regulačného cytokínu IL-10 u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s mDC bola pozorovaná u alergikov, avšak u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC bol tento nárast pozorovaný u zdravých. Podobné výsledky získal aj Farkas *et al.* vo svojej práci, kde po stimulácii alergénom bola produkcia tohto typického protizápalového cytokínu u CD4<sup>+</sup> T buniek kokultivovaných s pDC zvýšená čo koreluje s dátami uvedenými v tejto diplomovej práci [226]. U A skupiny pozorujeme, že sa produkcia IL-10 u CD4<sup>+</sup> kokultivovaných s mDC zvýšila. Naopak produkcia IL-10 bunkami kokultivovanými s pDC nesúvisí s alergiou o čom píše aj Matta *et al.* vo svojej práci [228]. Funkcia IL-10 sa okrem alergie prejavuje predovšetkým u tolerogénnych mechanizmov v transplantácii, autoimunita a u malignít [228]. Kassianos *et al.* popisuje v rámci Z skupiny po stimulácii kmeňom *E. coli* (kmeň XL1-Blue, Invitrogén) výrazne zvýšenú hladinu protizápalového IL-10 v porovnaní s kontrolami u mDC indukovaných Treg-ov, zatiaľ čo v diplomovej práci produkcia IL-10 u zdravej skupiny výrazná nebola [229]. Ich práca bola skúmaná na periférnej krvi zdravých darcov, z ktorej izoláciou a magnetickou separáciou získali monocyty, z ktorých vypestovali moDC. moDC boli následne inkubované s *E. coli*. Amoudruz *et al.* [230], Ismail *et al.* [231] a Hrdý *et al.* [232] vo svojich prácach publikovali nízku expresiu IL-10 u A skupiny. Hrdý stanovoval hladinu IL-10 v pupočníkovej krvi detí zdravých a alergických matiek prietokovou cytometriou. Obe skupiny tvorilo viac ako 70 jedincov. V ich práci bola zistená signifikantne vyššia produkcia IL-10 u Z v porovnaní s A, čo odpovedá aj našim zisteniam. V práci Ismaila boli pozorované nízke hladiny IL-10 po stimulácii CBMC novorodencov alergických matiek inaktivovaným kmeňom *Lactobacillus rhamnosus*.

Zvýšená expresia a sekrécia IL-10 v T bunkách kokultivovaných s mDC a pDC stimulovaných *E. coli* O83 u novorodencov alergických matiek naznačuje dostatočnú regulačnú funkciu, ktorá by mala potláčať neadekvátne imunitné odpovede. Vplyv probiotickej baktérie na indukciu regulačného cytokínu IL-10 bol popísaný viacerými autormi, konkrétne Contrerasom *et al.* [136], Niersom *et al.* [233], Yu *et al.* [244], Hrdým *et al.* [232].

Mengom *et al.* a Hrdým *et al.* bola preukázaná znížená sekrécia IL-10 Treg bunkami u detí alergických matiek [232,234].

Cytokíny IL-17A a IL-22 zastupujú Th17, poslednú nami skúmanú imunitnú odpoveď. U obidvoch skúmaných subpopulácií DC nie je produkcia IL17A indukovanými T-lymfocytmi ovplyvnená ani stimuláciou *E. coli* O83, ani alergickým stavom matiek novorodencov. Rozdiely sa objavujú u IL-22, kde u mDC pozorujeme zvýšenú produkciu u A skupiny oproti Z jedíncom. de Roock *et al.* porovnával imunitný systém novorodencov s dospelým systémom. Pozorovali percento IL-17<sup>+</sup> CD4 buniek, ktoré bolo u novorodencov signifikantne znížené porovnaním s periférnou krvou dospelých. Čo sa týka IL-22, dokázali rovnaké výsledky ako u IL-17<sup>+</sup> CD4 buniek [235].

### **Stimulácia DC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 zvyšuje produkciu cytokínov**

Metódou ELISA bola stanovovaná produkcia TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-10 v supernatante kultúr po 24 hod stimulácii mDC probiotickou *E. coli* O 83.

Zvýšená hladina IL-10 v alergickej skupine by mohla predstavovať kompenzačný mechanizmus v skupine so zvýšeným rizikom, avšak stále bez alergickej manifestácie, k čomu vo svojej práci dospel aj Žižka *et al.* [42]. Zvýšené hladiny TNF- $\alpha$ , a IL-6 po stimulácii alergénom u alergikov boli pozorované rovnako aj v práci Olssona *et. al.* [221], kde však ich analýza bola robená s použitím periférnej krvi.

## ZÁVER

Ciele práce boli uskutočnené analýzou vplyvu *E. coli* O83 na produkciu subpopulácií DC po ich získaní izoláciou *in vitro*. Bol porovnaný vplyv stimulácie DC medzi deťmi zdravých a alergických matiek. Nakoniec bola pozorovaná produkcia cytokínov metódou ELISA s rovnakou kohortou jedincov.

U oboch subpopulácií DC, bola detegovaná vyššia prítomnosť CD83<sup>+</sup> po stimulácii DC u alergickej skupiny.

V supernatante kultúr mDC po 24 hodinovej stimulácii *E. coli* O83 sa pozorovali signifikantne zvýšené hladiny cytokínov TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-10 než u kontrol. U alergickej skupiny bola detekcia po stimulácii *E. coli* O83 štatisticky signifikantná vo všetkých skúmaných cytokínoch porovnaním s kontrolami.

Nebol pozorovaný výrazný vplyv stimulácie dendritických buniek (ako mDC tak pDC) probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na polarizáciu imunitnej odpovede. Rozdiel je možné pozorovať skôr v odlišnej reaktivite CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov izolovaných z pupočníkovej krvi detí zdravých a alergických matiek poukazujúcich na všeobecne vyššiu reaktivitu buniek pupočníkovej krvi detí alergických matiek. Táto vyššia reaktivita by mohla viesť k neadekvátnej imunitnej odpovedi po stretnutí s prípadným alergénom a tým pádom podporovať vznik alergického ochorenia.

Z daných výsledkov uvedených v diplomovej práci nie je možné jednoznačne uzavrieť celú problematiku, ktorú sme sa snažili objasniť. Na to, by bola potreba väčšia kohorta pacientov – ako detí zdravých, tak alergických matiek. Rovnako by bolo dobré rozšíriť aj metodickú časť o výsledky z qRT-PCR. Na toto všetko je ale potrebné mať väčší počet buniek, s ktorými by sa dalo pracovať. Preto štúdie na objasnenie účinku pôsobenia probiotickej vakcíny *E. coli* O83 budú pokračovať.



## PRÍLOHA 1

Zoznam katalógových čísel protilátok, niektorých roztokov a reagensíí

- CD83 anti-human	PE	1P-677-T100	(Exbio, a. s.)
- CD11c anti-human	PE-Cy7	T7-529-T100	(Exbio, a. s.)
- CD123 anti-human	FITC	1F-700-T100	(Exbio, a. s.)
- CD4 anti-human	APC-Cy7	T4-359-T100	(Exbio, a. s.)
- T-bet anti-human	FITC	561266	(BD Bioscience)
- T-bet anti-human	FITC	3824055	(SONY)
- GATA3 anti-human	PE	653804	(BioLegend)
- GATA3 anti human	PE	3869015	(SONY)
- IL-4 anti-human	PE-Cy7	500824	(BioLegend)
- IL-4 anti human	PE-Cy7	3104115	(SONY)
- IL-13 anti-human	APC	501907	(BioLegend)
- IL-13 anti human	APC	3109540	(SONY)
- IFN- $\gamma$ anti-human	PerCP-Cy5.5	560704	(BD Bioscience)
- IFN- $\gamma$ anti human	PerCP-Cy5.5	3112625	(SONY)
- ROR $\gamma$ t anti-human	FITC	563621	(BD Bioscience)
- FoxP3 anti-human	APC	1A-601-C100	(Exbio)
- IL-22 anti-human	PE	366704	(BioLegend)
- IL-22 anti-human	PE	3176515	(SONY)
- IL-17A anti-human	PerCP-Cy5.5	560799	(BD Bioscience)
- IL-17A anti-human	PE-Cy7	3107095	(SONY)
- IL-10 anti-human	PE-Cy7	501420	(BioLegend)
- IL-10 anti-human	PE-Cy7	3107095	(SONY)
- Leukocyte Activation Cocktail (LAC)		550583	(BD Bioscience)
- CD3 (na stimuláciu buniek)		16-0037-85	(eBioscience)
- CD28 (na stimuláciu buniek)		16-0289-85	(eBioscience)
- Histopaque		10771-100ML	(Sigma- Aldrich)
- RPMI Medium 1640 Lonza		BE12-167F	(BioWhittaker)
- RPMI-1640 Sigma		R8758-500ML	(Sigma- Aldrich)
- Diluent Buffer		51-9008101	(BD Bioscience)
- Fix/Perm Buffer		51-9008100	(BD Bioscience)

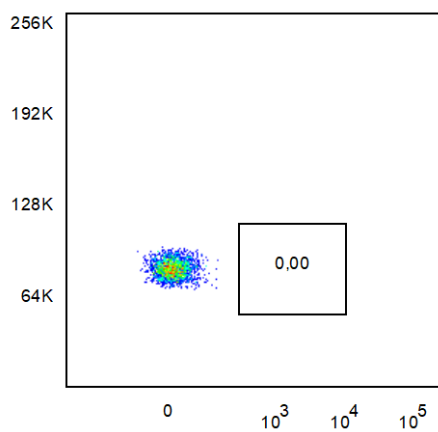
- Transcription Factor Perm (Wash Buffer) 51-9008102 (BD Bioscience)
- BSA A7030-100G (Sigma- Aldrich)
- Tween 27-434-8 (Sigma- Aldrich)
- Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit; human 130-094-487 (Miltenyi Biotec)
- CD34 MicroBead Kit; human 130-046-703 (Miltenyi Biotec)
- CD4<sup>+</sup> Tcell Isolation Kit; human 130-096-533 (Miltenyi Biotec)
- MACS Buffer 130-091-222 (Miltenyi Biotec)
- MACS Separation Columns 130-042-201 (Miltenyi Biotec)
- Cytokíny pre stavovanie ELISA testom – všetky od firmy R&D Systems (tab. 10)

Tab. 9: Cytokíny použité pri ELISA

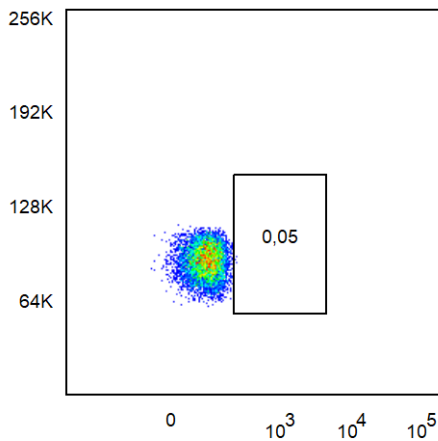
Cytokíny	Monoklonálne protilátky	Rekombinantné protilátky	Biotinylované protilátky
<b>IL-4</b>	MAB204	204-IL-010	BAF204
<b>IL-5</b>	MAB405	205-IL	BAM6051
<b>IL-6</b>	MAB206	206-IL	BAF206
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	MAB2852	285-IF-100	BAF285
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	MAB240	240-B	BAF240
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	MAB610	210-TA	BAF210

## PRÍLOHA 2

Bunky neznačené CD11c v prípade mDC a CD123 vrámci pDC



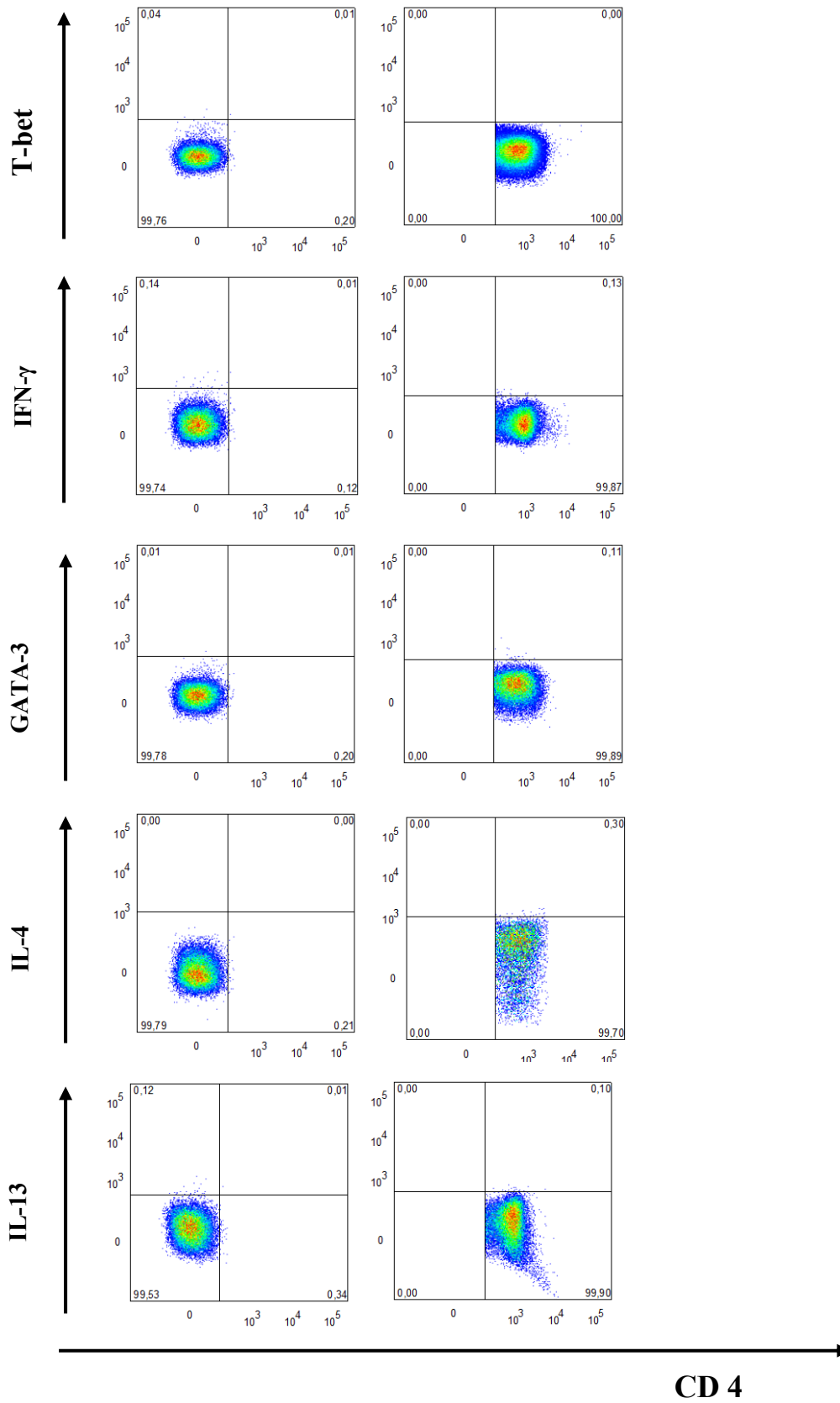
Bunky neznačené protilátkou *CD11c*

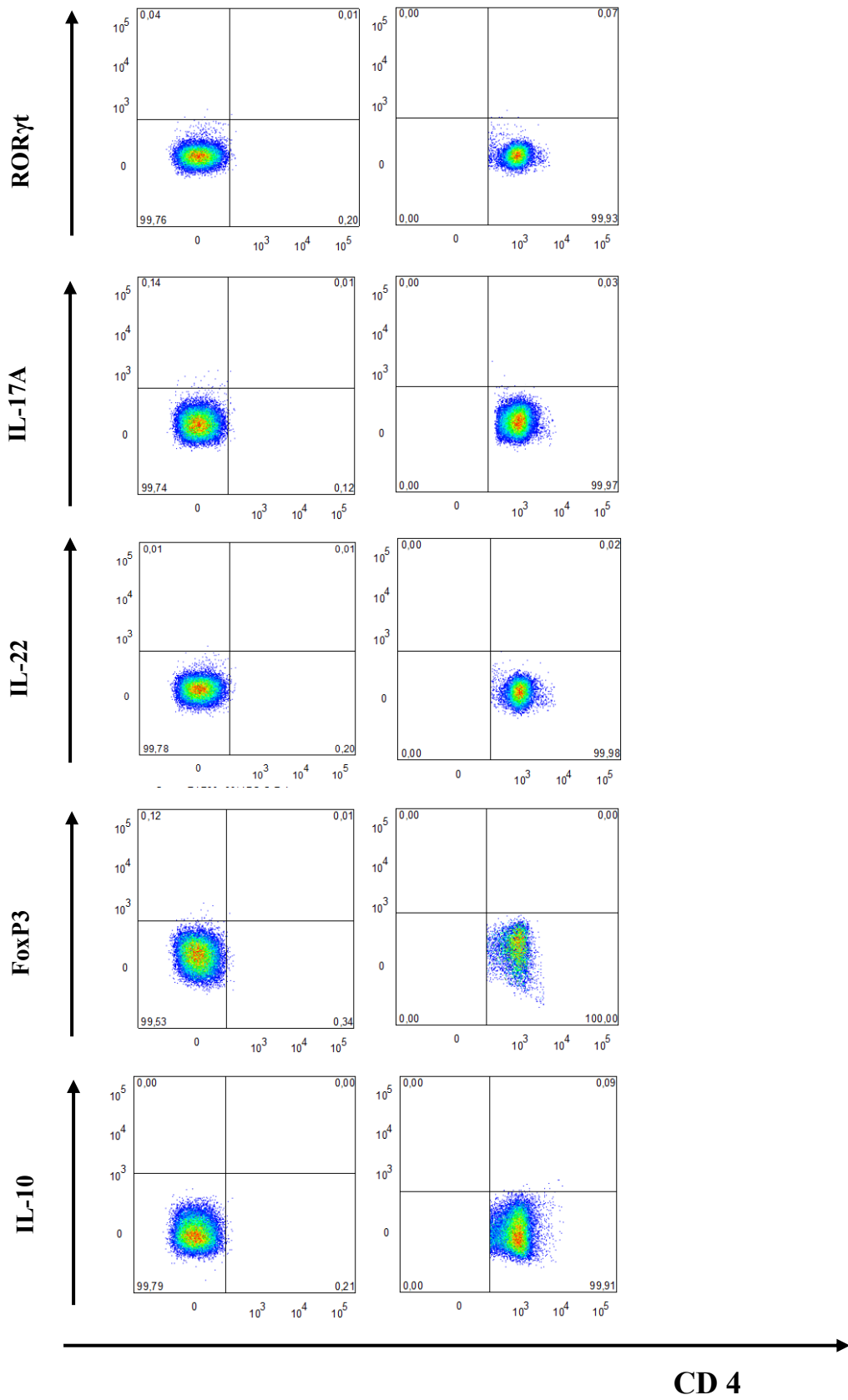


Bunky neznačené protilátkou *CD123*

# PRÍLOHA 3

Porovnanie negatívnej kontroly (vľavo) a FMO (vpravo)





## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] I. Mellman, M. Nussenzweig, Ralph M. Steinman (1943-2011), *Science* (80- ). 334 (2011) 466–466. doi:10.1126/science.1215136.
- [2] D.A. Rowley, F.W. Fitch, The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman, *Cell. Immunol.* 273 (2012) 95–98. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.002.
- [3] S. Scheurer, M. Toda, S. Vieths, What makes an allergen?, *Clin. Exp. Allergy.* 45 (2015) 1150–1161. doi:10.1111/cea.12571.
- [4] T. V. Rajan, The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation, *Trends Immunol.* 24 (2003) 376–379. doi:10.1016/S1471-4906(03)00142-X.
- [5] S.L. Prescott, C. Macaubas, B.J. Holt, T.B. Smallacombe, R. Loh, P.D. Sly, P.G. Holt, Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile., *J. Immunol.* 160 (1998) 4730–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590218>.
- [6] U. Rinas, G. Horneff, V. Wahn, Interferon production by cord blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE levels, *Pediatr. Allergy Immunol.* 4 (1993) 60–64. doi:10.1111/j.1399-3038.1993.tb00068.x.
- [7] R. van Ree, L. Hummelshøj, M. Plantinga, L.K. Poulsen, E. Swindle, L. Poulsen, G. Ladics, S. McClain, N. Doerrer, R. van Ree, G. Ladics, J. Fry, R. Goodman, C. Herouet-Guicheney, K. Hoffmann-Sommergruber, C. Madsen, A. Penninks, A. Pomés, E. Roggen, J. Smit, J.-M. Wal, E. Steed, M. Balda, K. Matter, E. Swindle, J. Collins, D. Davies, H. Wan, H. Winton, C. Soeller, E. Tovey, D. Gruenert, P. Thompson, G. Stewart, G. Taylor, D. Garrod, M. Cannell, C. Robinson, S. Post, M. Nawijn, T. Hackett, M. Baranowska, R. Gras, A. van Oosterhout, I. Heijink, U. Sajjan, Q. Wang, Y. Zhao, D. Gruenert, M. Hershenson, P. Glader, S. Möller, J. Lilja, E. Wieslander, C. Löfdahl, K. von Wachenfeldt, H. Atherton, G. Jones, H. Danahay, S. Holgate, C. Xiao, S. Puddicombe, S. Field, J. Haywood, V. Broughton-Head, I. Puxeddu, H. Haitchi, E. Vernon-Wilson, D. Sammut, N. Bedke, C. Cremin, J. Sones, R. Djukanović, P. Howarth, J. Collins, S. Holgate, P. Monk, D. Davies, P. Wark, S. Johnston, F. Bucchieri, R. Powell, S. Puddicombe, V. Laza-Stanca, S. Holgate, D. Davies, K. Takano, T. Kojima, M. Go, M. Murata, S. Ichimiya, T. Himi, N. Sawada, H. Hammad, M. Chieppa, F. Perros, M. Willart, R. Germain, B. Lambrecht, E. Swindle, D. Davies, R. Tarran, B. Button, M. Picher, A. Paradiso, C. Ribeiro, E. Lazarowski, L. Zhang, P. Collins, R. Pickles, J. Fredberg, R. Boucher, L. van Rijt, S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. Hoogsteden, B. Lambrecht, C. GeurtsvanKessel, M. Willart, L. van Rijt, F. Muskens, M. Kool, C. Baas, K. Thielemans, C. Bennett, B. Clausen, H. Hoogsteden, A. Osterhaus, G. Rimmelzwaan, B. Lambrecht, B. Lambrecht, H. Hammad, K. Liu, G. Victora, T. Schwickert, P. Guermonprez, M. Meredith, K. Yao, F. Chu, G. Randolph, A. Rudensky, M. Nussenzweig, A. Bachem, E. Hartung, S. Güttler, A. Mora, X. Zhou, A. Hegemann, M. Plantinga, E. Mazzini, P. Stoitzner, S. Gurka, V. Henn, H. Mages, R. Kroczeck, M. Haniffa, A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. Wasan, X. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, F. Ginhoux, B. Leon, M. Lopez-Bravo, C. Ardavin, H. Hammad, M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M. Willart, M. Kool, F. Muskens, B. Lambrecht, M. Willart, K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B.

- Lambrecht, H. Hammad, M. Plantinga, M. Williams, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, B. Lambrecht, T. Mosmann, H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, R. Coffman, A. Kelso, C. Asseman, S. Mauze, M. Leach, R. Coffman, F. Powrie, L. Steinman, K. Murphy, B. Stockinger, J. Mjosberg, H. Spits, L. Blom, B. Poulsen, B. Jensen, A. Hansen, L. Poulsen, L. Blom, L. Poulsen, Z. Allakhverdi, M. Comeau, H. Jessup, B. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S. Ziegler, M. Sarfati, G. Delespesse, W. Paul, J. Zhu, S. Tangye, C. Ma, R. Brink, E. Deenick, D. Cosman, C. Bossen, K. Ingold, A. Tardivel, J. Bodmer, O. Gaide, S. Hertig, C. Ambrose, J. Tschopp, P. Schneider, L. Chen, D. Flies, C. Sokol, N. Chu, S. Yu, S. Nish, T. Laufer, R. Medzhitov, T. Yoshimoto, K. Yasuda, H. Tanaka, M. Nakahira, Y. Imai, Y. Fujimori, K. Nakanishi, J. Perrigoue, S. Saenz, M. Siracusa, E. Allenspach, B. Taylor, P. Giacomini, M. Nair, Y. Du, C. Zaph, N. van Rooijen, M. Comeau, E. Pearce, T. Laufer, D. Artis, B. Sullivan, H. Liang, J. Bando, D. Wu, L. Cheng, J. McKerrow, C. Allen, R. Locksley, B. Poulsen, L. Poulsen, B. Jensen, A. Voskamp, S. Prickett, F. Mackay, J. Rolland, R. O'Hehir, J. Bernink, J. Mjosberg, H. Spits, J. Walker, A. McKenzie, S. Chan, V. Turcanu, A. Stephens, A. Fox, A. Grieve, G. Lack, J. DeLong, K. Simpson, E. Wambre, E. James, D. Robinson, W. Kwok, F. Medina, C. Segundo, A. Campos-Caro, I. González-García, J. Brieva, B. Hoyer, I. Mumtaz, T. Yoshida, F. Hiepe, A. Radbruch, E. Luger, V. Fokuhl, M. Wegmann, M. Abram, K. Tillack, G. Achatz, R. Manz, M. Worm, A. Radbruch, H. Renz, E. Mohr, K. Serre, R. Manz, A. Cunningham, M. Khan, D. Hardie, R. Bird, I. MacLennan, L. Hummelshoj, L. Ryder, L. Poulsen, L. Hummelshoj, L. Ryder, L. Poulsen, Allergic sensitization: host-immune factors, *Clin. Transl. Allergy*. 4 (2014) 12. doi:10.1186/2045-7022-4-12.
- [8] M. Jutel, C.A. Akdis, T-cell subset regulation in atopy, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 11 (2011) 139–145. doi:10.1007/s11882-011-0178-7.
- [9] S.J. Galli, M. Tsai, A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation, *Nature*. 454 (2008) 445–454. doi:10.1038/nature07204.
- [10] J.M. Spergel, From atopic dermatitis to asthma: The atopic march, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 105 (2010) 99–106. doi:10.1016/j.anai.2009.10.002.
- [11] A. Patrizi, A. Pileri, F. Bellini, B. Raone, I. Neri, G. Ricci, Atopic Dermatitis and the Atopic March: What Is New?, *J. Allergy*. 2011 (2011) 1–5. doi:10.1155/2011/279425.
- [12] S.G.A. Brown, S.F. Stone, D.M. Fatovich, S.A. Burrows, A. Holdgate, A. Celenza, A. Coulson, L. Hartnett, Y. Nagree, C. Cotterell, G.K. Isbister, Anaphylaxis: Clinical patterns, mediator release, and severity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013). doi:10.1016/j.jaci.2013.06.015.
- [13] H. Tlaskalová-Hogenová, R. Štěpánková, T. Hudcovic, L. Tučková, B. Cukrowska, R. Lodinová-Žádníková, H. Kozáková, P. Rossmann, J. Bártová, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovská, Z. Řeháková, J. Šinkora, J. Hofman, P. Drastich, A. Kokešová, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases, *Immunol. Lett.* 93 (2004) 97–108. doi:10.1016/j.imlet.2004.02.005.
- [14] H. Tlaskalová-Hogenová, R. Štěpánková, The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of ..., *Cell. Mol. ....* (2011). <http://www.nature.com/cmi/journal/v8/n2/abs/cmi201067a.html%5Cnpapers2://publication/uuid/59C168B1-0A80-4D9B-BEBA-4F6D7B9597C9>.

- [15] H. Tlaskalová-Hogenová, L. Tučková, R. Lodinová-Žádníková, R. Štěpánková, B. Cukrowska, D.P. Funda, I. Striž, H. Kozáková, I. Trebichavský, D. Sokol, Z. Řeháková, J. Šinkora, P. Fundová, D. Horáková, L. Jelínková, D. Sánchez, Mucosal immunity: Its role in defense and allergy, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128 (2002) 77–89. doi:10.1159/000059397.
- [16] J. Mestecky, Z. Moldoveanu, C.O. Elson, Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens, in: *Vaccine*, 2005: pp. 1800–1803. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.009.
- [17] H. Tlaskalova-Hogenova, R. Stepankova, L. Tuckova, M. a Farre, D.P. Funda, E.F. Verdu, J. Sinkora, T. Hudcovic, Z. Rehakova, B. Cukrowska, H. Kozakova, L. Prokesova, Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora., *Folia Microbiol. (Praha)*. 43 (1998) 545–550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9821323>.
- [18] L. Gonzalezmariscal, Tight junction proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81 (2003) 1–44. doi:10.1016/S0079-6107(02)00037-8.
- [19] K. Matter, M.S. Balda, Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay., *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1505–1511. doi:10.1242/jcs.005975.
- [20] J. Mankertz, S. Tavalali, H. Schmitz, a Mankertz, E.O. Riecken, M. Fromm, J.D. Schulzke, Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma., *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 1 (2000) 2085–2090. doi:10.1083/jcb.133.1.43.
- [21] K.R. Groschwitz, S.P. Hogan, Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis., *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 3–20–2. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- [22] K.L. Madsen, D. Malfair, D. Gray, J.S. Doyle, L.D. Jewell, R.N. Fedorak, Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora., *Inflamm. Bowel Dis.* 5 (1999) 262–270. doi:10.1097/00054725-199911000-00004.
- [23] J. Berkes, V.K. Viswanathan, S.D. Savkovic, G. Hecht, Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation, *Gut.* 52 (2003) 439–451. doi:10.1136/gut.52.3.439.
- [24] D. Ulluwishewa, R.C. Anderson, W.C. McNabb, P.J. Moughan, J.M. Wells, N.C. Roy, Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components., *J. Nutr.* 141 (2011) 769–776. doi:10.3945/jn.110.135657.
- [25] S. Resta-Lenert, K.E. Barrett, Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)., *Gut.* 52 (2003) 988–97. doi:10.1136/GUT.52.7.988.
- [26] A.A. Zyrek, C. Cichon, S. Helms, C. Enders, U. Sonnenborn, M.A. Schmidt, Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair, *Cell.*



- Microbiol. 9 (2007) 804–816. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x.
- [27] H. Qin, Z. Zhang, X. Hang, Y. Jiang, L. plantarum prevents enteroinvasive Escherichia coli-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells., BMC Microbiol. 9 (2009) 63. doi:10.1186/1471-2180-9-63.
- [28] J.B. Ewaschuk, H. Diaz, L. Meddings, B. Diederichs, A. Dmytrash, J. Backer, M. Looijer-van Langen, K.L. Madsen, Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 295 (2008) G1025–G1034. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008.
- [29] S. Resta-Lenert, K.E. Barrett, Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells., Gastroenterology. 130 (2006) 731–746. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.015.
- [30] J. Karczewski, F.J. Troost, I. Konings, J. Dekker, M. Kleerebezem, R.-J.M. Brummer, J.M. Wells, Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 298 (2010) G851–G859. doi:10.1152/ajpgi.00327.2009.
- [31] E.M. Brown, M. Sadarangani, B.B. Finlay, The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine., Nat. Immunol. 14 (2013) 660–7. doi:10.1038/ni.2611.
- [32] C. Burke, P. Steinberg, D.B. Rusch, S. Kjelleberg, T. Thomas, Bacterial community assembly based on functional genes rather than species, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108 (2011) 14288–14293. doi:10.1073/pnas.1101591108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1101591108.
- [33] D. Graf, R. Di Cagno, F. Fåk, H.J. Flint, M. Nyman, M. Saarela, B. Watzl, Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota., Microb. Ecol. Health Dis. 26 (2015) 26164. doi:10.3402/mehd.v26.26164.
- [34] I. Kocourková, R. Žádníková, J. Žižka, V. Rosová, Effect of oral application of a probiotic E. coli strain on the intestinal microflora of children of allergic mothers during the first year of life, Folia Microbiol. (Praha). 52 (2007) 189–193. doi:10.1007/BF02932158.
- [35] D.M. LILLY, R.H. STILLWELL, PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS., Science. 147 (1965) 747–8. doi:10.1126/science.147.3659.747.
- [36] Y. Vandenplas, G. Huys, G. Daube, Probiotics: An update, J. Pediatr. (Rio. J). 91 (2015) 6–21. doi:10.1016/j.jpeds.2014.08.005.
- [37] M. De Vrese, J. Schrezenmeir, Probiotics, prebiotics, and synbiotics, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111 (2008) 1–66. doi:10.1007/10\_2008\_097.
- [38] G. Moro, S. Arslanoglu, B. Stahl, J. Jelinek, U. Wahn, G. Boehm, A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age, Arch. Dis. Child. 91 (2006) 814–819. doi:10.1136/adc.2006.098251.
- [39] R. Lodinová-Zádníková, M. Slavíková, H. Tlaskalová-Hogenová, I. Adlerberth, L. a

- Hanson, a Wold, B. Carlsson, C. Svanborg, L. Mellander, The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with *Escherichia coli* O83., *Pediatr. Res.* 29 (1991) 396–399. doi:10.1203/00006450-199104000-00013.
- [40] R. Lodinova-Zadnikova, L. Prokešová, I. Kocourková, J. Hrdý, J. Žižka, Prevention of allergy in infants of allergic mothers by probiotic *Escherichia coli*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153 (2010) 201–206. doi:10.1159/000312638.
- [41] J. Hejnova, U. Dobrindt, R. Nemcova, C. Rusniok, A. Bomba, L. Frangeul, J. Hacker, P. Glaser, P. Sebo, C. Buchrieser, Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83:K24:H31), *Microbiology.* 151 (2005) 385–398. doi:10.1099/mic.0.27469-0.
- [42] J. Žižka, M. Kverka, O. Novotná, I. Staňková, R. Lodinová-Žádníková, I. Kocourková, I. Šterzl, L. Prokešová, Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development, *Folia Microbiol. (Praha).* 52 (2007) 549–555. doi:10.1007/BF02932118.
- [43] R.M. Steinman, C.L. Moberg, Zanvil Alexander Cohn 1926-1993., *J. Exp. Med.* 179 (1994) 1–30.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [44] R.M. Steinman, G. Kaplan, M.D. Witmer, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro., *J. Exp. Med.* 149 (1979) 1–16. doi:10.1084/jem.149.1.1.
- [45] R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, *J. Exp. Med.* 137 (1973) 1142–1162. doi:10.1084/jem.137.5.1142.
- [46] R.M. Steinman, Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- [47] M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, A. Mortha, The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting., *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- [48] M.F. Lipscomb, B.J. Masten, Dendritic cells: immune regulators in health and disease., *Physiol. Rev.* 82 (2002) 97–130. doi:10.1152/physrev.00023.2001.
- [49] B.P. Sorrentino, Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells., *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 878–888. doi:10.1038/nri1487.
- [50] G. Hemmrich, D.J. Miller, T.C.G. Bosch, The evolution of immunity: a low-life perspective, *Trends Immunol.* 28 (2007) 449–454. doi:10.1016/j.it.2007.08.003.
- [51] P. Matzinger, D.E. Koshland, P.J. Heidt, J.M. Vossen, G.R. Hill, P. Matzinger, P. Matzinger, S. Gallucci, P. Matzinger, R. Owen, R.E. Billingham, L. Brent, P.B. Medawar, P. Bretscher, M. Cohn, K.J. Lafferty, A. Cunningham, M.K. Jenkins, R.H. Schwartz, C.A. Janeway, \_\_\_\_, R. Medzhitov, C.A. Janeway, B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Janeway, R. Medzhitov, C. Janeway, D.A. Kimbrell, B. Beutler, A. Aderem, R.J. Ulevitch, S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, K. Ishii, N. Inohara, G. Nunez, J. Aliberti, A. Devitt, J. Pugin, A. Haziot, C. Fuqua,

- M.R. Parsek, E.P. Greenberg, C.P. Larsen, D.J. Lenschow, A.D. Kirk, J.C.J. Thomas, J. Lindenmann, P.A. Klein, J. Stavnezer, H. Kimata, M. Fujimoto, K. Benlagha, A. Bendelac, R. Boismenu, W.L. Havran, M. Girardi, V. Groh, A. Bendelac, M. Schwartz, C.T. Morita, P. Constant, M. Matzinger, E. Fuchs, N. Jerne, A. Coutinho, The danger model: a renewed sense of self., *Science*. 296 (2002) 301–5. doi:10.1126/science.1071059.
- [52] J.-L. Casanova, L. Abel, Inborn errors of immunity to infection, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 197–201. doi:10.1084/jem.20050854.
- [53] J.-L. Casanova, L. Abel, Primary immunodeficiencies: a field in its infancy., *Science*. 317 (2007) 617–9. doi:10.1126/science.1142963.
- [54] J.-L. Casanova, Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E7128-37. doi:10.1073/pnas.1521651112.
- [55] P.S. Linsley, E.A. Clark, J.A. Ledbetter, T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 5031–5035. doi:10.1073/pnas.87.13.5031.
- [56] G. Liu, L. Zhang, Y. Zhao, Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells, *Clin. Exp. Immunol.* 160 (2010) 168–175. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04091.x.
- [57] S. Sakaguchi, K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, Regulatory T cells: How do they suppress immune responses?, *Int. Immunol.* 21 (2009) 1105–1111. doi:10.1093/intimm/dxp095.
- [58] J.R. Podojil, S.D. Miller, Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules: Successes and challenges, *BioDrugs*. 27 (2013) 1–13. doi:10.1007/s40259-012-0001-6.
- [59] R.M. Steinman, The control of immunity and tolerance by dendritic cells, in: *Pathol. Biol.*, 2003: pp. 59–60. doi:10.1016/S0369-8114(03)00096-8.
- [60] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity., *Nature*. 392 (1998) 245–252. doi:10.1038/32588.
- [61] O. Joffre, M.A. Nolte, R. Spörri, C.R.E. Sousa, Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity, *Immunol. Rev.* 227 (2009) 234–247. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.
- [62] M. Moser, K.M. Murphy, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development., *Nat. Immunol.* 1 (2000) 199–205. doi:10.1038/79734.
- [63] G. De Becker, V. Moulin, F. Tielemans, F. De Mattia, J. Urbain, O. Leo, M. Moser, Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells, *Eur J Immunol.* 28 (1998) 3161–3171. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3161::AID-IMMU3161>3.0.CO;2-Q.
- [64] I. Gutcher, B. Becher, APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1119–1127. doi:10.1172/JCI31720.

- [65] C.S. Hsieh, S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, K.M. Murphy, Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages., *Science*. 260 (1993) 547–9. doi:10.1126/science.8097338.
- [66] M. Stein, S. Keshav, N. Harris, S. Gordon, Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation., *J. Exp. Med.* 176 (1992) 287–92. doi:10.1084/jem.176.1.287.
- [67] M. Tajima, D. Wakita, D. Noguchi, K. Chamoto, Z. Yue, K. Fugo, H. Ishigame, Y. Iwakura, H. Kitamura, T. Nishimura, IL-6–dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17–producing CD8 + T cells, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1019–1027. doi:10.1084/jem.20071133.
- [68] A. Kimura, T. Naka, T. Kishimoto, IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12099–12104. doi:10.1073/pnas.0705268104.
- [69] N. Manel, D. Unutmaz, D.R. Littman, The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 641–649. doi:10.1038/ni.1610.
- [70] S. Mayor, R.E. Pagano, Pathways of clathrin-independent endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 603–612. doi:10.1038/nrm2216.
- [71] N. Kanazawa, Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells, *J. Dermatol. Sci.* 45 (2007) 77–86. doi:10.1016/j.jdermsci.2006.09.001.
- [72] A. Plüddemann, C. Neyen, S. Gordon, Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands, *Methods*. 43 (2007) 207–217. doi:10.1016/j.ymeth.2007.06.004.
- [73] J. Canton, D. Neculai, S. Grinstein, Scavenger receptors in homeostasis and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 621–634. doi:10.1038/nri3515.
- [74] L. Meertens, X. Carnec, M.P. Lecoïn, R. Ramdasi, F. Guivel-Benhassine, E. Lew, G. Lemke, O. Schwartz, A. Amara, The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry, *Cell Host Microbe*. 12 (2012) 544–557. doi:10.1016/j.chom.2012.08.009.
- [75] G. Lemke, C. V. Rothlin, Immunobiology of the TAM receptors, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 327–336. doi:10.1038/nri2303.
- [76] M.A. West, R.P.A. Wallin, S.P. Matthews, H.G. Svensson, R. Zaru, H.-G. Ljunggren, A.R. Prescott, C. Watts, Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling., *Science*. 305 (2004) 1153–7. doi:10.1126/science.1099153.
- [77] E. Procko, M.L. O'Mara, W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, R. Gaudet, The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter, *FASEB J.* 23 (2009) 1287–1302. doi:10.1096/fj.08-121855.
- [78] E.J.A.M. Sijts, P.M. Kloetzel, The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1491–1502.

doi:10.1007/s00018-011-0657-y.

- [79] J. Neefjes, M.L.M. Jongsma, P. Paul, O. Bakke, Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 823–836. doi:10.1038/nri3084.
- [80] S. Murata, Y. Takahama, K. Tanaka, Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 192–196. doi:10.1016/j.coi.2008.03.002.
- [81] G. van Niel, R. Wubbolts, W. Stoorvogel, Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (2008) 437–444. doi:10.1016/j.ceb.2008.05.011.
- [82] T. ten Broeke, R. Wubbolts, W. Stoorvogel, MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013). doi:10.1101/cshperspect.a016873.
- [83] J.M. Blander, R. Medzhitov, Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells., *Nature.* 440 (2006) 808–12. doi:10.1038/nature04596.
- [84] N.A. Kukutsch, S. Roßner, J.M. Austyn, G. Schuler, M.B. Lutz, Formation and kinetics of MHC class I-ovalbumin peptide complexes on immature and mature murine dendritic cells, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 449–453. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00084.x.
- [85] A. Sijts, Y. Sun, K. Janek, S. Kral, A. Paschen, D. Schadendorf, P.M. Kloetzel, The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing, *Mol. Immunol.* 39 (2002) 165–169. doi:10.1016/S0161-5890(02)00099-8.
- [86] M. Rescigno, S. Citterio, C. Thèry, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, P. Ricciardi-Castagnoli, Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5229–34. doi:10.1073/pnas.95.9.5229.
- [87] J.P.-Y. Ting, J. Trowsdale, Genetic Control of MHC Class II Expression, *Cell.* 109 (2002) S21–S33. doi:10.1016/S0092-8674(02)00696-7.
- [88] N.S. Wilson, D. El-Sukkari, J.A. Villadangos, Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis, *Blood.* 103 (2004) 2187–2195. doi:10.1182/blood-2003-08-2729.
- [89] C.D. Platt, J.K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R.A.D. Carano, I. Mellman, L. Delamarre, Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 4287–4292. doi:10.1073/pnas.0910609107.
- [90] L. Delamarre, H. Holcombe, I. Mellman, Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 111–22. doi:10.1084/jem.20021542.
- [91] J.-S. Shin, M. Ebersold, M. Pypaert, L. Delamarre, A. Hartley, I. Mellman, Surface

- expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination, *Nature*. 444 (2006) 115–118. doi:10.1038/nature05261.
- [92] S. Ishido, Y. Matsuki, E. Goto, M. Kajikawa, M. Ohmura-Hoshino, MARCH-I: A new regulator of dendritic cell function, *Mol. Cells*. 29 (2010) 229–232. doi:10.1007/s10059-010-0051-x.
- [93] A. De Gassart, V. Camosseto, J. Thibodeau, M. Ceppi, N. Catalan, P. Pierre, E. Gatti, MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3491–3496. doi:10.1073/pnas.0708874105.
- [94] K. Inaba, S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R.N. Germain, I. Mellman, R.M. Steinman, The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 927–36. doi:10.1084/jem.191.6.927.
- [95] J.A. Villadangos, P. Schnorrer, N.S. Wilson, Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: A balance between creative and destructive forces, *Immunol. Rev.* 207 (2005) 191–205. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00317.x.
- [96] S. Jansen, A. Collins, C. Yang, G. Rebowski, T. Svitkina, R. Dominguez, Mechanism of actin filament bundling by fascin, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 30087–30096. doi:10.1074/jbc.M111.251439.
- [97] R. Ross, H. Jonuleit, M. Bros, X.L. Ross, A.H. Enk, J. Knop, A.B. Reske-Kunz, S. Yamashiro, F. Matsumura, Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 658–663. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00112.x.
- [98] M. Bros, X.-L. Ross, A. Pautz, A.B. Reske-Kunz, R. Ross, The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer., *J. Immunol.* 171 (2003) 1825–1834. doi:10.4049/jimmunol.171.4.1825.
- [99] P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.H. de Ru, P.J. Hensbergen, K. Mizuno, H.K. Koerten, F. Koning, C.P. Tensen, A.M. Mommaas, Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 156–164. doi:10.1002/eji.200324241.
- [100] D.Y. Wong, D. Sept, The interaction of cofilin with the actin filament, *J. Mol. Biol.* 413 (2011) 97–105. doi:10.1016/j.jmb.2011.08.039.
- [101] G.J. Randolph, J. Ochando, S. Partida-Sánchez, Migration of dendritic cell subsets and their precursors., *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 293–316. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254.
- [102] D. Alvarez, E.H. Vollmann, U.H. von Andrian, Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration, *Immunity*. 29 (2008) 325–342. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.006.
- [103] R.J. Greenwald, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, the B7 Family Revisited, *Dx.Doi.Org.* 23 (2004) 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.

- [104] A.H. Sharpe, E.J. Wherry, R. Ahmed, G.J. Freeman, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection., *Nat. Immunol.* 8 (2007) 239–45. doi:10.1038/ni1443.
- [105] S. Yao, Y. Zhu, G. Zhu, M. Augustine, L. Zheng, D.J. Goode, M. Broadwater, W. Ruff, S. Flies, H. Xu, D. Flies, L. Luo, S. Wang, L. Chen, B7-H2 Is a Costimulatory Ligand for CD28 in Human, *Immunity.* 34 (2011) 729–740. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.014.
- [106] B. O’Sullivan, R. Thomas, CD40 and dendritic cell function, *Crit Rev Immunol.* 23 (2003) 83–107.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12906261](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12906261).
- [107] A.T. Prechtel, A. Steinkasserer, CD83: An update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells, *Arch. Dermatol. Res.* 299 (2007) 59–69. doi:10.1007/s00403-007-0743-z.
- [108] D.N. Hart, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response., *Blood.* 90 (1997) 3245–3287.
- [109] M. Lechmann, S. Berchtold, A. Steinkasserer, J. Hauber, CD83 on dendritic cells: More than just a marker for maturation, *Trends Immunol.* 23 (2002) 273–275. doi:10.1016/S1471-4906(02)02214-7.
- [110] F. Granucci, C. Vizzardelli, E. Virzi, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 2539–2546. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2539::AID-IMMU2539>3.0.CO;2-9.
- [111] T.T. Espir, L.D.P. Figueira, M.D.F. Naiff, A.G. Da Costa, M. Ramalho-Ortigão, A. Malheiro, A.M.R. Franco, The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil, *J. Immunol. Res.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/481750.
- [112] S.E. Macatonia, N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, A. O’Garra, Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells., *J. Immunol.* 154 (1995) 5071–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730613>.
- [113] S. Romagnani, T-cell subsets (Th1 versus Th2), *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 85 (2000) 9–21. doi:10.1016/S1081-1206(10)62426-X.
- [114] C.A. Hunter, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions, *Nat Rev Immunol.* 5 (2005) 521–531. doi:10.1038/nri1648.
- [115] M. Saraiva, A. O’Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 170–181. doi:10.1038/nri2711.
- [116] T. Walzer, M. Dalod, S.H. Robbins, L. Zitvogel, E. Vivier, Natural-killer cells and dendritic cells: “L’union fait la force,” *Blood.* 106 (2005) 2252–2258. doi:10.1182/blood-2005-03-1154.
- [117] D.M. Hilbert, M.P. Cancro, P.A. Scherle, R.P. Nordan, J. Van Snick, W. Gerhard, S.

- Rudikoff, T cell derived IL-6 is differentially required for antigen-specific antibody secretion by primary and secondary B cells, *J Immunol.* 143 (1989) 4019–4024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480384>.
- [118] C. Pasare, R. Medzhitov, Toll Pathway– Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells, *Science.* 299 (2003) 1033–1036. doi:10.1126/science.1078231.
- [119] F. Granucci, S. Feau, V. Angeli, F. Trottein, P. Ricciardi-Castagnoli, Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming., *J. Immunol.* 170 (2003) 5075–5081. doi:10.4049/jimmunol.170.10.5075.
- [120] R. Sporri, S. Reis e, Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function, *Nat.Immunol.* 6 (2005) 163–170. doi:10.1038/ni1162.
- [121] M.B. Lutz, G. Schuler, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol.* 23 (2002) 445–449. doi:10.1016/S1471-4906(02)02281-0.
- [122] J.-S. Frick, F. Grünebach, I.B. Autenrieth, Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6., *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 19–24. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.010.
- [123] S.K. Mazmanian, H.L. Cui, A.O. Tzianabos, D.L. Kasper, An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system, *Cell.* 122 (2005) 107–118. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007.
- [124] C. Kumar, S. Kohli, P.P. Bapsy, A.K. Vaid, M. Jain, V.S.S. Attili, B. Sharan, Immune modulation by dendritic-cell-based cancer vaccines, *J. Biosci.* 42 (2017) 161–173. doi:10.1007/s12038-017-9665-x.
- [125] X. Liao, A.M. Reihl, X.M. Luo, Breakdown of immune tolerance in systemic lupus erythematosus by dendritic cells, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/6269157.
- [126] J.J. Lafaille, The Role of Helper T Cell Subsets in Autoimmune Diseases, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998) 139–151. doi:10.1016/S1359-6101(98)00009-4.
- [127] S.T. Holgate, Pathogenesis of Asthma, in: *Allergy Allerg. Dis. Second Ed.*, 2009: pp. 1608–1631. doi:10.1002/9781444300918.ch78.
- [128] D. Amsen, J.M. Blander, G.R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, R.A. Flavell, Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells, *Cell.* 117 (2004) 515–526. doi:10.1016/S0092-8674(04)00451-9.
- [129] A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher, Functional diversity of helper T lymphocytes., *Nature.* 383 (1996) 787–93. doi:10.1038/383787a0.
- [130] A.E. Kelly-Welch, Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps, *Science* (80-. ). 300 (2003) 1527–1528. doi:10.1126/science.1085458.
- [131] W. Ouyang, S.H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W.C. Sha, K.M.



- Murphy, Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism, *Immunity*. 9 (1998) 745–755. doi:10.1016/S1074-7613(00)80671-8.
- [132] D.H. Zhang, L. Yang, L. Cohn, L. Parkyn, R. Homer, P. Ray, A. Ray, Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3, *Immunity*. 11 (1999) 473–482. doi:10.1016/S1074-7613(00)80122-3.
- [133] F.L. van der Heijden, E.A. Wierenga, J.D. Bos, M.L. Kapsenberg, High Frequency of IL-4-Producing CD4+ Allergen-Specific T Lymphocytes in Atopic Dermatitis Lesional Skin, *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991) 389–394. doi:10.1111/1523-1747.ep12480966.
- [134] Q. Hamid, T. Naseer, E.M. Minshall, Y.L. Song, M. Boguniewicz, D.Y.M. Leung, In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 (1996) 225–231. doi:10.1016/S0091-6749(96)70246-4.
- [135] S.-H. Cho, L.A. Stanciu, S.T. Holgate, S.L. Johnston, Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005) 224–30. doi:10.1164/rccm.200310-1416OC.
- [136] J.P. Contreras, N.P. Ly, D.R. Gold, H. He, M. Wand, S.T. Weiss, D.L. Perkins, T.A.E. Platts-Mills, P.W. Finn, Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 1072–1077. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.036.
- [137] P.J. Barnes, Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 183–192. doi:10.1038/nri2254.
- [138] D. a Randolph, C.J. Carruthers, S.J. Szabo, K.M. Murphy, D.D. Chaplin, Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma., *J. Immunol.* 162 (1999) 2375–2383.
- [139] B. Stockinger, M. Veldhoen, Differentiation and function of Th17 T cells, *Curr. Opin. Immunol.* 19 (2007) 281–286. doi:10.1016/j.coi.2007.04.005.
- [140] C.T. Weaver, L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli, K.M. Murphy, Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties, *Immunity*. 24 (2006) 677–688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002.
- [141] C. Infante-Duarte, H.F. Horton, M.C. Byrne, T. Kamradt, Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 6107–6115. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6107.
- [142] Ivanov II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, D.R. Littman, The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells, *Cell*. 126 (2006) 1121–1133. doi:S0092-8674(06)01105-6 [pii] 10.1016/j.cell.2006.07.035.
- [143] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, V.K. Kuchroo, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature*. 441 (2006) 235–238. doi:10.1038/nature04753.

- [144] M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, B. Stockinger, TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, *Immunity*. 24 (2006) 179–189. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- [145] M.J. McGeachy, K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, D.J. Cua, TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1390–1397. doi:10.1038/ni1539.
- [146] J. Verhagen, K. Blaser, C.A. Akdis, M. Akdis, Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: T-Regulatory Cells and More, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26 (2006) 207–231. doi:10.1016/j.iac.2006.02.008.
- [147] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases., *J. Immu.* 155 (1995) 1151–1164. doi:10.4049/jimmunol.1202464.
- [148] S. Sakaguchi, Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annu Rev Immunol.* 22 (2004) 531–562. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- [149] K. Wing, Z. Feng, S. Sakaguchi, Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells, *Int. Immunol.* 18 (2006) 991–1000. doi:10.1093/intimm/dxl044.
- [150] E.M. Ling, T. Smith, X.D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V.A. Carr, D.S. Robinson, Relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease, *Lancet.* 363 (2004) 608–615. doi:10.1016/S0140-6736(04)15592-X.
- [151] O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell.* 140 (2010) 805–820. doi:S0092-8674(10)00023-1 [pii]r10.1016/j.cell.2010.01.022.
- [152] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature.* 388 (1997) 394–397. doi:10.1038/41131.
- [153] S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira, S. Uematsu, S. Uematsu, O. Takeuchi, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity., *Cell.* 124 (2006) 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [154] S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis, *Cell.* 118 (2004) 229–241. doi:10.1016/j.cell.2004.07.002.
- [155] D. Han, M. Walsh, P. Cejas, N. Dang, Y. Kim, J. Kim, L. Charrier-Hisamuddin, L. Chau, Q. Zhang, K. Bittinger, F. Bushman, L. Turka, H. Shen, B. Reizis, A. DeFranco, G. Wu, Y. Choi, Dendritic Cell Expression of the Signaling Molecule TRAF6 Is Critical for Gut Microbiota-Dependent Immune Tolerance, *Immunity.* 38 (2013) 1211–1222. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.012.
- [156] M. Dalod, R. Chelbi, B. Malissen, T. Lawrence, Dendritic cell maturation: Functional

- specialization through signaling specificity and transcriptional programming, *EMBO J.* 33 (2014) 1104–1116. doi:10.1002/embj.201488027.
- [157] K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, Toll-Like Receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 335–376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- [158] K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity, *Int. Immunol.* 17 (2005) 1–14. doi:10.1093/intimm/dxh186.
- [159] S. Janssens, R. Beyaert, Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003) 637–646. doi:10.1128/CMR.16.4.637.
- [160] J.L. Slack, K. Schooley, T.P. Bonnert, J.L. Mitcham, E.E. Qwarnstrom, J.E. Sims, S.K. Dower, Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4670–4678. doi:10.1074/jbc.275.7.4670.
- [161] S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 499–511. doi:10.1038/nri1391.
- [162] T.B.H. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis, Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses., *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 465–79. doi:10.1038/nri2569.
- [163] O. Gross, A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster, J. Ruland, Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity, *Nature.* 442 (2006) 651–656. doi:10.1038/nature04926.
- [164] A.S.J. Marshall, J.A. Willmen, H.H. Lin, D.L. Williams, S. Gordon, G.D. Brown, Identification and Characterization of a Novel Human Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like Receptor (MICL) That Is Predominantly Expressed on Granulocytes and Monocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14792–14802. doi:10.1074/jbc.M313127200.
- [165] A.M. Kerrigan, G.D. Brown, C-type lectins and phagocytosis, *Immunobiology.* 214 (2009) 562–575. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.003.
- [166] M. PrabhuDas, D. Bowdish, K. Drickamer, M. Febbraio, J. Herz, L. Kobzik, M. Krieger, J. Loike, T.K. Means, S.K. Moestrup, S. Post, T. Sawamura, S. Silverstein, X.-Y. Wang, J. El Khoury, Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature, *J. Immunol.* 192 (2014) 1997–2006. doi:10.4049/jimmunol.1490003.
- [167] J.L. Goldstein, Y.K. Ho, S.K. Basu, M.S. Brown, Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 333–337. doi:10.1073/pnas.76.1.333.
- [168] J.C. Sirard, C. Vignal, R. Dessein, M. Chamaillard, Nod-like receptors: Cytosolic watchdogs for immunity against pathogens, *PLoS Pathog.* 3 (2007) 1829–1836. doi:10.1371/journal.ppat.0030152.
- [169] V. Motta, F. Soares, T. Sun, D.J. Philpott, NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 149–178. doi:10.1152/physrev.00009.2014.

- [170] A. Sabbah, T.H. Chang, R. Harnack, V. Frohlich, K. Tominaga, P.H. Dube, Y. Xiang, S. Bose, Activation of innate immune antiviral responses by Nod2., *Nat. Immunol.* 10 (2009) 1073–80. doi:10.1038/ni.1782.
- [171] L. Franchi, N. Warner, K. Viani, G. Nuñez, Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense., *Immunol. Rev.* 227 (2009) 106–28. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.
- [172] F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp, The inflammasomes: guardians of the body, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 229–265. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715.
- [173] K. Kobayashi, N. Inohara, L.D. Hernandez, J.E. Galan, G. Nunez, C.A. Janeway, R. Medzhitov, R.A. Flavell, RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems, *Nature.* 416 (2002) 194–199. doi:10.1038/416194a.
- [174] N. Inohara, T. Koseki, J. Lin, L. Del Peso, P.C. Lucas, F.F. Chen, Y. Ogura, G. Núñez, An induced proximity model for NF- $\kappa$ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27823–27831. doi:10.1074/jbc.M003415200.
- [175] B.K. Davis, H. Wen, J.P.-Y. Ting, The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases., *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011) 707–35. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405.
- [176] S. Mariathasan, D.S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O’Rourke, M. Roose-Girma, W.P. Lee, Y. Weinrauch, D.M. Monack, V.M. Dixit, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP, *Nature.* 440 (2006) 228–232. doi:10.1038/nature04515.
- [177] D. Perregaux, C.A. Gabel, 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, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15195–15203.
- [178] C. Dostert, G. Guarda, J.F. Romero, P. Menu, O. Gross, A. Tardivel, M.L. Suva, J.C. Stehle, M. Kopf, I. Stamenkovic, G. Corradin, J. Tschopp, Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal, *PLoS One.* 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0006510.
- [179] Y. Shi, J.E. Evans, K.L. Rock, Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells, *Nature.* 425 (2003) 516–521. doi:10.1038/nature01991.
- [180] Y. Zhao, J. Yang, J. Shi, Y.-N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu, F. Shao, The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus, *Nature.* 477 (2011) 596–600. doi:10.1038/nature10510.
- [181] R.E. Vance, The NAIP/NLRC4 inflammasomes, *Curr. Opin. Immunol.* 32 (2015) 84–89. doi:10.1016/j.coi.2015.01.010.
- [182] Y.M. Loo, M. Gale, Immune Signaling by RIG-I-like Receptors, *Immunity.* 34 (2011) 680–692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003.
- [183] H. Kato, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, S. Akira, Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response, *Immunity.* 23 (2005) 19–28. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.010.

- [184] M. Colonna, G. Trinchieri, Y.-J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1219–1226. doi:10.1038/ni1141.
- [185] K. Shortman, S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development., *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 19–30. doi:10.1038/nri1996.
- [186] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J.M. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn, M.B. Lutz, Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood, *Blood.* 116 (2010). doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
- [187] S. Vandenabeele, H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel, K. Shortman, Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations, *Blood.* 97 (2001) 1733–1741. doi:10.1182/blood.V97.6.1733.
- [188] K. Sato, S. Fujita, Dendritic cells: nature and classification., *Allergol. Int.* 56 (2007) 183–191. doi:10.2332/allergolint.R-06-139.
- [189] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, J. Schmitz, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood., *J. Immunol.* 165 (2000) 6037–46. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6037.
- [190] P. Szabolcs, K.-D. Park, M. Reese, L. Marti, G. Broadwater, J. Kurtzberg, Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method, *Stem Cells.* 21 (2003) 296–303. doi:10.1634/stemcells.21-3-296.
- [191] K. Shortman, W.R. Heath, The CD8+ dendritic cell subset, *Immunol. Rev.* 234 (2010) 18–31. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
- [192] J. Diao, E. Winter, W. Chen, C. Cantin, M.S. Cattral, Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow., *J. Immunol.* 173 (2004) 1826–33. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.3.1826.
- [193] M. Collin, N. Mcgovern, M. Haniffa, Human dendritic cell subsets, *Immunology.* 140 (2013) 22–30. doi:10.1111/imm.12117.
- [194] M. Guillemins, P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, B.N. Lambrecht, The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages., *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 94–108. doi:10.1038/nri3582.
- [195] T. Kaisho, Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets, *Vaccine.* 30 (2012) 7652–7657. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.043.
- [196] C. Huysamen, J.A. Willment, K.M. Dennehy, G.D. Brown, CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 16693–16701. doi:10.1074/jbc.M709923200.
- [197] S. Zelenay, A.M. Keller, P.G. Whitney, B.U. Schraml, S. Deddouche, N.C. Rogers, O. Schulz, D. Sancho, C. Reis E Sousa, The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1615–1627. doi:10.1172/JCI60644.

- [198] S. Iborra, H.M. Izquierdo, M. Martínez-López, N. Blanco-Menéndez, C. Reis E Sousa, D. Sancho, The DC receptor DNNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1628–1643. doi:10.1172/JCI60660.
- [199] L.F. Poulin, Y. Reyal, H. Uronen-Hansson, B.U. Schraml, D. Sancho, K.M. Murphy, U.K. Håkansson, L.F. Moita, W.W. Agace, D. Bonnet, C. Reis E Sousa, DNNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues, *Blood*. 119 (2012) 6052–6062. doi:10.1182/blood-2012-01-406967.
- [200] C.E. Angel, E. George, A.E.S. Brooks, L.L. Ostrovsky, T.L.H. Brown, P.R. Dunbar, Cutting edge: CD1a<sup>+</sup> antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands., *J Immunol.* 176 (2006) 5730–4. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5730.
- [201] L.C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, R.M. Steinman, J.G. Krueger, M.A. Lowes, A.T. Larregina, L.D. Faló, J. Valladeau, S. Saeland, R.E. Hunger, R. Cerio, C.E. Griffiths, K.D. Cooper, B.J. Nickoloff, J.T. Headington, P. Henriksson, S. Becker, G. Lynch, J. McDonagh, D. Torocsik, H. Bardos, L. Nagy, R. Adany, P.S. Freudenthal, R.M. Steinman, K.L. Summers, B.D. Hock, J.L. McKenzie, D.N. Hart, K.P. MacDonald, M. Brigl, M.B. Brenner, A. Granelli-Piperno, S.R. Krutzik, S. Gordon, P.R. Taylor, F. Wang, V.J. Tormey, C.E. Angel, F.O. Nestle, X.G. Zheng, C.B. Thompson, L.A. Turka, B.J. Nickoloff, L. Meunier, A. Gonzalez-Ramos, K.D. Cooper, M. Deguchi, S. Aiba, H. Ohtani, H. Nagura, H. Tagami, F.O. Nestle, L.A. Turka, B.J. Nickoloff, M. Dupasquier, P. Stoitzner, A. van Oudenaren, N. Romani, P.J. Leenen, J. Narbutt, D.P. Fivenson, B.J. Nickoloff, B. de Saint-Vis, S. Ebner, B.O. Fabriek, C.D. Dijkstra, T.K. van den Berg, E.P. McGreal, J.L. Miller, S. Gordon, R.M. Steinman, H. Hemmi, P.J. Lea, A. Pawlowski, H. Fujita, Y. Nishii, K. Yamashita, S. Kawamata, K. Yoshikawa, C.R. Taylor, R.R. Anderson, R.W. Gange, N.A. Michaud, T.J. Flotte, A.W. Lee, Normal human dermis contains distinct populations of CD11c<sup>+</sup>BDCA-1<sup>+</sup> dendritic cells and CD163<sup>+</sup>FXIIIa<sup>+</sup> macrophages., *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2517–25. doi:10.1172/JCI32282.
- [202] A.G. Jegalian, F. Facchetti, E.S. Jaffe, Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states, *Adv. Anat. Pathol.* 16 (2009) 392–404. doi:10.1097/PAP.0b013e3181bb6bc2.
- [203] J.R. Tversky, T. V Le, a P. Bieneman, K.L. Chichester, R.G. Hamilton, J.T. Schroeder, Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9., *Clin. Exp. Allergy.* 38 (2008) 781–8. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02954.x.
- [204] M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells., *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 471–485. doi:10.1038/nri3865.
- [205] I. Bekeredjian-Ding, J. Greil, S. Ammann, M. Parcina, Plasmacytoid dendritic cells: Neglected regulators of the immune response to staphylococcus aureus, *Front. Immunol.* 5 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00238.
- [206] T. Kaisho, Molecular mechanisms for plasmacytoid dendritic cell function and development, *Vaccine.* 28 (2010) 8046–8047. doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.025.
- [207] M. Gilliet, W. Cao, Y.-J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 594–606.

doi:10.1038/nri2358.

- [208] U. O'Doherty, M. Peng, S. Gezelter, W.J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, R.M. Steinman, Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature., *Immunology*. 82 (1994) 487–93. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1414873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [209] M. Rissoan, Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation, *Science* (80-. ). 283 (1999) 1183–1186. doi:10.1126/science.283.5405.1183.
- [210] L.J. Zhou, R. Schwarting, H.M. Smith, T.F. Tedder, A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily., *J. Immunol*. 149 (1992) 735–742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378080>.
- [211] M. Lechmann, E. Zinser, A. Golka, A. Steinkasserer, Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells, *Int. Arch. Allergy Immunol*. 129 (2002) 113–118. doi:10.1159/000065883.
- [212] C. Aerts-Toegaert, C. Heirman, S. Tuyaerts, J. Corthals, J.L. Aerts, A. Bonehill, K. Thielemans, K. Breckpot, K. Breckpot, CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses, *Eur. J. Immunol*. 37 (2007) 686–695. doi:10.1002/eji.200636535.
- [213] S.L. Prescott, B. King, T.L. Strong, P.G. Holt, The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age., *Allergy*. 58 (2003) 1187–1194. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00263.x.
- [214] R. Lodinova-Zadnikova, B. Cukrowska, H. Tlaskalova-Hogenova, Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years), *Int. Arch. Allergy Immunol*. 131 (2003) 209–211. doi:10.1159/000071488.
- [215] G.-Q. Zhang, H.-J. Hu, C.-Y. Liu, Q. Zhang, S. Shakya, Z.-Y. Li, Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials., *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016) e2562. doi:10.1097/MD.0000000000002562.
- [216] L. Súkeníková, V. Černý, O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, L. Kolářová, L. Prokešová, J. Hrdý, Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain *E. coli* O83:K24:H31, *Immunol. Lett.* (2017). doi:10.1016/j.imlet.2017.05.013.
- [217] L. Jiao, X. Han, S. Wang, Y. Fan, M. Yang, H. Qiu, X. Yang, Imprinted DC mediate the immune-educating effect of early-life microbial exposure, *Eur. J. Immunol*. 39 (2009) 469–480. doi:10.1002/eji.200838367.
- [218] J. Žižka, J. Hrdý, R. Lodinová-Žádníková, I. Kocourková, O. Novotná, I. Šterzl, L. Prokešová, Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes, *Pediatr. Allergy Immunol*. 18 (2007) 486–494.

doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00563.x.

- [219] L. Prokešová, Gene expression of subunits of the IL-12 family cytokines in moDCs derived in vitro from the cord blood of children of healthy and allergic mothers, *Folia Biol. (Praha)*. 60 (2014) 74–82.
- [220] S. Vale-Pereira, A. Todo-Bom, L. Geraldes, C. Schmidt-Weber, C.A. Akdis, A. Mota-Pinto, FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma, *Clin. Exp. Allergy*. 41 (2011) 490–496. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03640.x.
- [221] S. Olsson, F. Cagnoni, P. Dignetti, G. Melioli, G.W. Canonica, Low concentrations of cytokines produced by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells have potent effects on nasal polyp-derived fibroblasts, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 254–260. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02148.x.
- [222] M.K. Tulic, M. Hodder, A. Forsberg, S. McCarthy, T. Richman, N. DVaz, A.H.J. Van Den Biggelaar, C.A. Thornton, S.L. Prescott, Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: New insights into immune ontogeny, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011). doi:10.1016/j.jaci.2010.09.020.
- [223] J. Hrdý, O. Novotná, I. Kocourková, L. Prokešová, The effect of the colostrum cells on gene expression of cytokines in cord blood cells, *Folia Microbiol. (Praha)*. (2017) 1–5. doi:10.1007/s12223-017-0519-6.
- [224] S.L. Prescott, C. Macaubas, T. Smallacombe, B.J. Holt, P.D. Sly, R. Loh, P.G. Holt, Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants, *Clin Exp Allergy*. 28 Suppl 5 (1998) 31–39. doi:10.1046/j.1365-2222.1998.028s5039.x.
- [225] J. Hrdý, P. Zanvit, O. Novotná, I. Kocourková, J. Žižka, L. Prokešová, Cytokine expression in cord blood cells of children of healthy and allergic mothers, *Folia Microbiol. (Praha)*. 55 (2010) 515–519. doi:10.1007/s12223-010-0085-7.
- [226] L. Farkas, E.O. Kvale, F.E. Johansen, F.L. Jahnsen, F. Lund-Johansen, Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: Modulation by CpG oligodeoxynucleotides, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 436–443. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.035.
- [227] B. Danis, T.C. George, S. Goriely, B. Dutta, J. Renneson, L. Gatto, P. Fitzgerald-Bocarsly, A. Marchant, M. Goldman, F. Willems, D. de Wit, Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 507–517. doi:10.1002/eji.200737760.
- [228] B.M. Matta, A. Castellaneta, A.W. Thomson, Tolerogenic plasmacytoid DC, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 2667–2676. doi:10.1002/eji.201040839.
- [229] A.J. Kassianos, M.Y. Hardy, X. Ju, D. Vijayan, Y. Ding, A.J.E. Vulink, K.J. McDonald, S.L. Jongbloed, R.B. Wadley, C. Wells, D.N.J. Hart, K.J. Radford, Human CD1c (BDCA-1) + myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 1512–1522. doi:10.1002/eji.201142098.



- [230] P. Amoudruz, U. Holmlund, V. Malmström, C. Trollmo, K. Bremme, A. Scheynius, E. Sverremark-Ekström, Neonatal immune responses to microbial stimuli: Is there an influence of maternal allergy?, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 1304–1310. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.036.
- [231] I.H. Ismail, R.J. Boyle, L.J. Mah, P. V. Licciardi, M.L.K. Tang, Reduced neonatal regulatory T cell response to microbial stimuli associates with subsequent eczema in high-risk infants, *Pediatr. Allergy Immunol.* 25 (2014) 674–684. doi:10.1111/pai.12303.
- [232] J. Hrdý, I. Kocourková, L. Prokešová, Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers, *Clin. Exp. Immunol.* 170 (2012) 10–17. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x.
- [233] L.E.M. Niers, M.O. Hoekstra, H.M. Timmerman, N.O. Van Uden, P.M.A. De Graaf, H.H. Smits, J.L.L. Kimpfen, G.T. Rijkers, Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: Immunomodulation of neonatal dendritic cells, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 344–352. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03421.x.
- [234] S. Meng, R. Gao, B. Yan, J. Ren, F. Wu, P. Chen, J. Zhang, L. Wang, Y. Xiao, J. Liu, Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells, *Respir. Res.* 17 (2016) 114. doi:10.1186/s12931-016-0430-8.
- [235] S. De Roock, A.J. Stoppelenburg, R. Scholman, S.B.E.A. Hoeks, J. Meerding, B.J. Prakken, M. Boes, Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013). doi:10.1016/j.jaci.2013.04.014.

## **Knihy**

- BUC, M. 2012. *Základná a klinická imunológia*. Bratislava : Veda, 2012. 832 s. ISBN 978-80-224-1235-3.
- BUREŠ, J. *et al.*, 2015. *Vnitřní lékařství*. 2. vyd. Praha : Galén, 2015. 1400 s. ISBN 978-80-749-2145-2.
- OWEN, J.A. *et al.*, 2013. *Kuby Immunology*. 7th edition. New York : W.H. Freeman and Company, 2013. 801 s. ISBN 978-14292-1919-8.
- MURPHY, K., WEAVER, C. 2017. *Janeway's imunobiology*. 9th ed. New York, NY : Garland Science, Taylor & Francis. 2017. 904 p. ISBN 978-0-8153-4551-0.

## **Internetové publikácie a stránky**

- FRÜHAUF, P. 2011. Mikrobiota v období mezi 6. a 24. měsícem věku, In *Pediatric propraxi* [online]. 2011, 12 (3) : 214-216. ISSN 1803-5264. Dostupné na internete: <<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/03/18.pdf>>.
- HÁJKOVÁ, A. 2013. *Dynamika kolonizace trávicího traktu člověka bakteriemi rezistentními k antibiotikům* : diplomová práce. Brno : Přírodovědecká fakulta, 2013. 87 s.

- ORSKOV, I. *et al.*, 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of PMC414020. Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC414020/>>.
- TOURNUT, J. 1989. Applications of probiotics to animal husbandry, In *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties* [online]. 1989, 8 (2) : 551-566. ISSN 0253 1933. Dostupné na internete: <<https://www.oie.int/doc/ged/D8331.PDF>>.
- VANDENPLAS, Y. *et al.* 2015. Probiotics: an update, In *Journal de Pédiatrie (Rio J)* [online]. 2015, 91 (1) : 6-21. doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.08.005. ISSN 0021-7557. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021755714001478?via%3Dihub>>.
- YU, H.R. *et al.* 2017. L-Arginine-Dependent Epigenetic Regulation of Interleukin-10, but Not Transforming Growth Factor- $\beta$ , Production by Neonatal Regulatory T Lymphocytes In *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, 8 : 487. doi.org/10.3389/fimmu.2017.00487. Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403834/pdf/fimmu-08-00487.pdf>>.
- ŽÁDNIKOVÁ, R. *et al.* 2006. Prevention of allergy in infants of allergic mothers by oral colonization with probiotic E. coli after birth. In *Alergie* [online]. 2006, 6 (2) : 49. ISSN 1212-687X. Dostupné na internete: <<http://docplayer.cz/24809347-Prevence-alergie-u-deti-alergickych-matek-peroralnim-osidlenim-probiotickym-kmenem-e-coli-po-narozeni.html>>.