

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

**ZMĚNY V GENOVÉ EXPRESI MAKROFÁGOVÉ A B-BUNĚČNÉ LINIE PO
INFEKCI INTRACELULÁRNÍM PATOGENEM *FRANCISELLA TULARENSIS***

diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.

Hradec Králové, 2006/2007

Lucie Živná

Děkuji svým školitelům RNDr. Zuzaně Kročové, Ph.D a PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. a laborantce paní Márii Šafářové za pomoc při práci i psychickou podporu.

Obsah

1	Teoretická část	9
1.1	<i>Francisella tularensis</i>	9
1.1.1	<i>F. tularensis</i> – původce tularemie	9
1.1.2	<i>F. tularensis</i> – patogen	9
1.1.3	<i>F. tularensis</i> – imunita	10
1.2	Interakce <i>F. tularensis</i> s hostitelskými buňkami	11
1.2.1	Interakce s makrofágy	11
1.2.1.1	Fagocytóza	11
1.2.1.2	Lokalizace <i>F. tularensis</i> v makrofázích	12
1.2.1.3	Mechanismus působení <i>F. tularensis</i> v makrofázích	13
1.2.1.4	Osud makrofágů infikovaných <i>F. tularensis</i>	13
1.2.1.5	Signální cesty aktivované přes TLR	14
1.2.1.6	Vliv <i>F. tularensis</i> na signální cesty aktivované přes TLR	17
1.2.2	Interakce s B-buňkami	18
1.2.2.1	Úloha B-buněk v průběhu časné imunitní odpovědi k <i>F. tularensis</i>	18
1.2.2.2	Interakce B-buněk s <i>F. tularensis</i>	20
1.2.3	Signální cesty ovlivněné LPS	21
1.2.3.1	<i>F. tularensis</i> LPS	21
1.2.3.2	Indukce signálních cest	22
2	Experimentální část	24
2.1	Použitý materiál	24
2.1.1	Buněčné linie, bakterie	24
2.1.2	Primery pro RT-PCR	24
2.1.3	Média, roztoky a chemikálie	25
2.1.3.1	Média, roztoky a chemikálie pro RT-PCR	25
2.1.3.2	Ostatní média, roztoky a chemikálie	26
2.1.4	Přístroje a pomůcky	27
2.2	Pracovní postup	29
2.2.1	Příprava buněčné suspenze	29
2.2.1.1	Zamrazování buněčných suspenzí	29
2.2.1.2	Rozmrazování buněčných suspenzí	29
2.2.1.3	Kultivace a pasážování buněk A20 a J774	30
2.2.1.4	Určení koncentrace a životnosti buněk	31
2.2.1.5	Příprava buněčné suspenze pro infekci	32
2.2.2	Příprava bakteriální suspenze	32
2.2.3	Výsev a odečet CFU	33
2.2.4	Detekce genové exprese metodou RT-PCR	33
2.2.4.1	Infekce a stimulace buněk A20 a J774	33
2.2.4.2	Izolace RNA	37
2.2.4.3	Stanovení koncentrace RNA	39
2.2.4.4	Syntéza cDNA	41
2.2.4.5	Amplifikace cDNA	42
2.2.4.6	Elektroforéza	43
3	Výsledky	45
3.1	Provedení infekce a izolace RNA č. 1	45
3.2	Provedení infekce a izolace RNA č. 2	51
3.3	Provedení infekce a izolace RNA č. 3	61
4	Diskuse	65

5	Závěr	71
6	Použitá literatura.....	72

Seznam zkratek

ASC	apoptosis-associated speck-line protein containing a caspase recruitment domain
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
BLP	bakteriální lipopeptid (bacterial lipopeptide)
BSA	Bovine Serum Albumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
DEPC	diethylpyrocarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EEA1	časný endozomální antigen 1 (early endosomal antigen 1)
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCP	fagozóm obsahující <i>F. tularensis</i> (<i>F. tularensis</i> -containing phagosome)
FCV	vakuola obsahující <i>F. tularensis</i> (<i>F. tularensis</i> -containing vacuole)
FPI	tularemický ostrov patogenicity (<i>Francisella</i> pathogenicity island)
HSP	protein teplotního šoku (heat shock protein)
i.p.	intraperitoneální podání
i.v.	intravenózní podání
IFN	interferon
IKK-i	inducibilní IκB kináza (IkappaB kinase)
IL	interleukin
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
IP-10	interferon-inducible protein 10
IPAF	ICE protease activating factor
IRAK	kináza asociovaná s receptorem pro IL-1 (IL-1R-associated kinase)
IRF-3	interferonem regulovaný faktor 3 (interferon regulatory factor 3)

JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAMP	lyzozomální integrální membránový protein (lysosomal integral membrane protein)
LBP	protein vázající lipopolysacharid (LPS-binding protein)
LD ₅₀	střední letální dávka (median lethal dose)
LPS	lipopolysacharid
LRR	na leucin bohatá opakující se doména (leucin-rich repeat domain)
LVS	live vaccine strain
MAL	MyD88 adaptor-like protein
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza (mitogen-activated protein kinase)
MD-2	myeloid differentiation factor-2
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (major histocompatibility complex)
MKK6 MAP	MAP kináza kináza 6 (MAP kinase kinase 6)
MOI	multiplicita infekce (multiplicity of infection)
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NF-κB	nukleární faktor kappa B (nuclear factor-kappa B)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
O.D.	optická denzita
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (pathogen-associated molecule pattern)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)
PDGF	růstový faktor produkovaný destičkami (platelet-derived growth factor)
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKR	protein kináza R (protein kinase R)
PRR	receptory rozeznávající PAMP (pattern-recognition receptor)
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse

s.c.	subkutánní podání
TAK1	kináza aktivující TGF- β (TGF- β -activating kinase 1)
Tbk-1	TANK-vážíci kináza 1 (TANK-binding kinase 1)
TICAM	Toll/IL-1R-containing adaptor molecule
TIR	Toll/IL-1 receptorová doména (Toll/IL-1 receptor domain)
TIRAP	Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein
TLR	receptor skupiny Toll (Toll Like Receptor)
TNF- α	faktor nekrotizující nádory alfa (tumor necrosis factor alfa)
TOLLIP	protein interagující s Toll (Toll-interacting protein)
TRAF6	faktor 6 asociovaný s receptorem pro TNF (TNF-receptor-associated factor 6)
TRAM	INF- β -related adaptor molecule transcriptase polymerase chain reaction)
TRIF	Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Úvod

Stimulací receptoru TLR4 na povrchu makrofágů lipopolysacharidem gram-negativních bakterií se aktivují dvě různé signální cesty. Signální cesta závislá na adaptorovém proteinu MyD88 vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a tím k produkci cytokinu TNF- α a dalších prozánětlivých cytokinů. Signální cesta nezávislá na MyD88 aktivuje transkripční faktor IRF-3, který řídí produkci chemokinu IP-10 a interferonů 1. třídy IFN- α a INF- β . Tato druhá signální cesta je běžně indukovaná viry přes receptor TLR3. U *F. tularensis* bylo prokázáno, že u makrofágů inhibuje aktivaci NF- κ B a tím i produkci TNF- α .

Na povrchu B-buněk byly identifikovány dva navzájem nezávislé receptory pro lipopolysacharid. Signalizace přes TLR4 závislá na adaptorovém proteinu MyD88 vede stejně jako u makrofágů k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. Receptor RP105 je preferenčně exprimován na B-buňkách, indukuje signální cesty vedoucí k JNK a NF- κ B. Zatím nebylo publikováno, zda *F. tularensis* ovlivňuje i tyto signální cesty.

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda u monocyto-makrofágové buněčné linie J774 dochází při infekci *F. tularensis* k aktivaci signální cesty nezávislé na MyD88. U B-buněčné linie A20 jsme zjišťovali, jestli při infekci *F. tularensis* dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a jestli podobně jako u makrofágů existuje také paralelní cesta aktivace.

K pokusům jsme využili metodu reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce. Sledovali jsme změny v genové expresi makrofágové a B-buněčné linie vlivem infekce *F. tularensis* nebo stimulace bakteriálním lipopolysacharidem.

1 Teoretická část

1.1 *Francisella tularensis*

1.1.1 *F. tularensis* – původce tularemie

K objevení nového patogenu, který byl nazván *Bacterium tularense*, dovedlo McCoye a Chapina vypuknutí choroby podobné moru mezi veverkami v Tulare County v Kalifornii v roce 1911. Díky výzkumu Edwarda Francise bylo zjištěno, že *Bacterium tularense* je také původcem několika chorob člověka. Tyto choroby jsou dnes souhrnně označovány jako tularemie. *Bacterium tularense* byla na počest Dr. Francise přejmenována na *Francisella tularensis* (1).

F. tularensis způsobuje zoonózu tularemii u mnoha savců. V jejím životním cyklu hrají důležitou roli králíci, zajáci, hraboši, myši, veverky, ondatry a bobří, ale také přechodní vektoři mouchy, komáři a klíšťata. *F. tularensis* má zřejmě ještě další přírodní zdroj. Za jeden z možných rezervoárů jsou považovány améby, výskyt několika poddruhů je také spojen s vodou (2,3).

Člověk může získat tularemii během manipulace s nakaženými zvířaty, požitím kontaminované vody nebo potravy, kousnutím hmyzu sajícího krev nebo vdechnutím aerosolu obsahujícího bakterie (4). Bakterie se pomnoží v místě nákazy a rozšíří se do lymfatických uzlin, jater a sleziny. Tularemie se často projevuje symptomy podobnými chřipce: bolest hlavy, horečka, třes, nevolnost, průjem, pneumonie. Nemoc je manifestována respirační, orofaryngeální, gastrointestinální nebo ulceroglandulární formou, které se mohou vyvinout ve formu tyfoidní (5).

1.1.2 *F. tularensis* – patogen

F. tularensis je fakultativně intracelulární, gramnegativní, nepohyblivá, nesporulující tyčkovitá bakterie (4).

Francisella je jediný rod třídy *Francisellaceae*. V rámci rodu *Francisella* jsou na základě podobnosti DNA a složení mastných kyselin rozlišovány 2 druhy: *tularensis* a *philomiragia*. Druh *Francisella tularensis* je rozčleněn do 5 poddruhů: *tularensis* (také někdy označován jako *F. tularensis* typu A), *novicida*, *mediasiatica*, *holarctica*

(*F. tularensis* typu B) a varianta poddruhu *holarctica* nalezená v Japonsku. *Francisella philomiragia* je ondatří patogen (3).

Pouze *F. tularensis* subsp. *tularensis* a subsp. *holarctica* způsobují onemocnění u člověka. Subsp. *tularensis* se vyskytuje v Severní Americe, způsobuje těžké akutní onemocnění, končící často smrtí pacienta. Letální infekci vyvolá již 10 bakterií podaných subkutánně nebo 25 vdechnutých bakterií. Subsp. *holarctica* je rozšířen hlavně v Evropě, centrální Asii a Skandinávii, onemocnění je mírnější a úmrtnost nižší. Pro svoji extrémní nakažlivost různými cestami, nízkou infekční dávkou, snadné šíření aerosolem a schopnost způsobit těžké onemocnění a smrt jsou tyto 2 poddruhy zařazeny do kategorie A možných prostředků bioterorismu. Podle údajů Světové zdravotnické organizace by po rozprášení 50 kg virulentní bakterie *F. tularensis* ve formě aerosolu nad velkoměstem o 5 milionech obyvatel vyžadovalo intenzivní zdravotní péči 250 000 nemocných, 19 000 případů by skončilo smrtí (1,3,4).

Oslabením *F. tularensis* subsp. *holarctica* byl odvozen kmen *F. tularensis* LVS. Tento kmen má nízkou virulenci u lidí, což je důležité pro bezpečnost výzkumných pracovníků. U myši ale způsobuje smrtelné onemocnění, které se z hlediska histopatologie podobá lidské tularemii (LD₅₀ pro i.p. podání je 1 bakterie, LD₅₀ pro s.c. nebo i.d. podání je 1 x 10⁵ bakterií). Proto je tento kmen využíván jako modelový intracelulární patogen, který by mohl pomoci objasnit imunologii a patogenezi *F. tularensis* i jiných intracelulárních patogenů (1).

1.1.3 *F. tularensis* – imunita

Podobně jako u jiných intracelulárních bakterií, je po infekci myši *F. tularensis* LVS vyvolána silná a dlouhotrvající primární imunitní odpověď zahrnující rychlou produkci IFN- γ , TNF- α , IL-12, aktivaci makrofágů, neutrofilů a iNOS. Pro dlouhodobou kontrolu primární i sekundární infekce LVS je hlavní aktivace a pomnožení specifických T-buněk. Účast různých T-buněk se mění v síle a důležitosti s časovým intervalem po infekci. Úloha B-buněk, NK anebo NK T-buněk zatím nebyla plně objasněna (1).

1.2 Interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami

F. tularensis má schopnost infikovat množství lidských a zvířecích fagocytujících i nefagocytujících buněk (např. hepatocyty, fibroblasty, endoteliální buňky, epiteliální buňky, buňky HeLa) a pomnožit se v nich (2). Obecně jsou za hlavní rezervoár *F. tularensis in vivo* považovány makrofágy (lidské, myší, krysí, králičí a morčecí) (3).

1.2.1 Interakce s makrofágy

1.2.1.1 Fagocytóza

K fagocytóze mikroorganismů a částic dochází po specifické interakci mezi receptory a ligandami a je umožněná polymerizací aktinu (3). Při internalizaci mnoha intracelulárních patogenů hraje důležitou roli komplement a receptory komplementu, jejichž interakce umožní těsný kontakt bakterie s makrofágem anebo aktivaci intracelulárních signálních cest. Ultrastuktura vlastního procesu je různá. Při klasické fagocytóze (např. *M. tuberculosis*) vede interakce mezi ligandy na povrchu částic a fagocytickými receptory k těsnému obklopení částice symetrickými panožkami. *L. pneumophila* je pohlcována několika velmi těsnými vrstvami asymetrických panožek (4).

F. tularensis je obklopována prostornými asymetrickými kličkami z panožek, které se během několika sekund až minut změňí ve fagozóm. Tvorbu asymetrických prostorných panožek spouští nejen živé, ale také formalínem nebo teplem usmrcené bakterie, není tedy závislá na metabolické aktivitě bakterie. Bakteriální molekula aktivující tento proces je zároveň termostabilní a odolná vůči působení proteáz. Zvažována je role lipopolysacharidu. Po oxidaci a zesíťení bakteriálních povrchových uhlovodíků je aktivována pouze klasická fagocytóza. Podle Clemense a kol. (2005) je pro internalizaci *F. tularensis* nutná přítomnost komplementu a zvláště komplementového receptoru CR3 (4,5).

1.2.1.2 Lokalizace *F. tularensis* v makrofázích

Obecně prochází fagozóm během zrání několika fázemi. Fáze časného endozómu je regulována Rab5 GTPázou, pH vnitřního obsahu se pohybuje kolem hodnoty 6,5. Fáze pozdního endozómu je kontrolována molekulou Rab7. Pozdní endozóm je okyselen ATPázou na pH 5,0 – 5,5. Následně dochází k fúzi s lyzozómem. Fagolyzozóm obsahuje množství oxidačních činidel, kationických antimikrobiálních peptidů a hydroláz, které dokáží zabít a rozložit pohlcenou bakterii. Celý proces proběhne během několika minut od pohlcení bakterie nebo inertní částice (3,5). Pro každou fázi zrání endozómu jsou typické určité znaky. Ve fázi časného endozómu lze detekovat transferrin, receptor pro transferrin a EEA1. Mezi znaky pozdního endozómu a lyzozómu patří CD63, LAMP-1 a LAMP-2 a kyselé hydrolázy, např. Cathepsin D (8).

Aby byly intracelulární bakterie schopné přežít a množit se uvnitř hostitelské buňky, vyvinuly několik strategií obcházejících degradační obranné mechanismy. Jednou z možností je únik pomocí lýzy membrány fagozómu krátce po fagocytóze a následné pomnožení v cytoplazmě hostitelské buňky (např. *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp.). Některé druhy bakterií jsou naopak schopné pozměnit vývoj fagozómu ve svůj prospěch, množí se ve fagozómu (např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*) nebo ve fagolyzozómu (např. *Coxiella burnetii*) (5,8).

Vývoj fagozómu obsahujícího živou *F. tularensis* (FCP) je výjimečný. V porovnání s některými intracelulárními bakteriemi není u *F. tularensis* znám žádný sekreční systém, který by jí umožnil zastavit zrání fagozómu. Během přibližně 4 hodin po infekci prochází FCP vývojem přes časný endozóm, vyznačující se znakem EEA1, k pozdnímu endozómu se znakem LAMP-1 a LAMP-2. Kyselé hydrolázy jako např. Cathepsin D ovšem nejsou v FCP přítomny; pH změřené v endozómu 3-4 hodiny po infekci má hodnotu 6,7 rovnající se pH okolní cytoplazmy. Na ultrastrukturální úrovni lze rozeznat neporušenou fagozomální membránu první 2 hodiny po infekci. Do 8-12 hodin po infekci dochází k postupnému rozrušení fagozomální membrány a uvolnění bakterií do cytoplazmy, kde se množí. Při fagocytóze usmrcené *F. tularensis* má pH pozdního endozómu hodnotu 5,5, Cathepsin D je přítomen a dochází k fúzi fagozómu s lyzozómem (5).

Přibližně 9 hodin po infekci lze v cytoplazmě detekovat multilamelární struktury FCV obsahující bakterie, které mají charakter autofagozómu. Jejich tvorba je podmíněna určitým stupněm pomnožení bakterie uvnitř buňky anebo aktivní syntézou

proteinů. U *F. tularensis* zřejmě slouží k prezentaci tularemických antigenů zprostředkované přes MHC II T-buňkám (7,9).

1.2.1.3 Mechanismus působení *F. tularensis* v makrofázích

Důležitou roli při zastavení zrání fagozomu ve fázi pozdního endozómu 2-4 hodiny po infekci zřejmě hrají proteiny IglA, IglC, PdpA a PdpD, kódované geny v oblasti o velikosti 33,9 kb označované jako ostrov patogenicity (FPI) a jejich regulátory MglA a MglB. Geny MglA a MglB se podobají genům pro proteiny SspA u *E. coli*, které během nutričního stresu fungují jako regulátory transkripce. Tato oblast je mezi ostatními bakteriálními druhy ojedinělá. Při pokusech, kdy geny této oblasti byly inaktivovány, bakterie nebyly schopné uniknout z fagozomu a pomnožit se uvnitř hostitelské buňky. Dalšími proteiny, které mají vliv na intracelulární přežití bakterie, jsou alanin racemáza, glutamin fosforibosylpyrofosfát amidotransferáza a ClpB proteáza (2,5).

1.2.1.4 Osud makrofágů infikovaných *F. tularensis*

Stěžejní úloha makrofágů během imunitních reakcí zahrnuje několik mechanismů: (i) pohlcování a destrukce bakterií, parazitů, virů a infikovaných buněk, (ii) uvolňování cytokinů ovlivňujících další buňky imunitního systému, (iii) zpracování antigenů a prezentace pohlcených peptidů T-buňkám, (iv) oprava poškozených tkání. Jsou nepostradatelní při aktivaci přirozené i získané imunity. Intracelulární patogeny vyvinuly množství různých způsobů, kterými si vytváří vhodné podmínky pro růst a množení uvnitř eukaryotických hostitelských buněk. Často se jedná o syntézu specifických proteinů (10).

Mikroorganismy jsou také schopné regulovat apoptózu makrofágů a jiných hostitelských buněk ve svůj vlastní prospěch. Některé intracelulární bakterie inhibují apoptózu. Např. *Rickettsia* spp. aktivací NF- κ B signální cesty ochrání infikované buňky cévního endotelu. Naopak jiné bakterie apoptózu vyvolávají, např. *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolica*. *Chlamydie* spp. v časně fázi infekce apoptózu inhibuje, v pozdních fázích apoptózu navozuje. Na druhou stranu může apoptóza sloužit jako

obranný mechanismus hostitelské buňky, kterým brání adaptaci mikroorganismu v intracelulárním prostředí (10,11).

U *F. tularensis* byly popsány dva rozdílné mechanismy apoptózy. Během časně fáze infekce je aktivována apoptóza zprostředkovaná cestou kaspázy-1 závislá na ASC. 90 % buněk je usmrceno během 5 hodin. Jedná se o způsob primární obrany hostitelských buněk. Kaspáza-1 aktivovaná prostřednictvím adaptorové molekuly ASC umožní přeměnu prozánětlivých cytokinů pro-IL-1 β a pro-IL-18 na zralé, aktivní formy IL-1 β a IL-18, které se účastní obrany hostitelské buňky vůči intracelulárnímu patogenu. Kaspáza-1 je cysteinová proteáza značící smrt hostitelské buňky.

V pozdější fázi infekce je buněčná smrt aktivována vnitřní cestou nezávislou na kaspáze-1. Důležitá je zde účast mitochondrií uvolňujících cytochrom c. Následuje aktivace kaspázy-9, tvorba apoptozómu a aktivace kaspázy-3 detekovatelné 12-18 hodin po infekci. Buňky jsou usmrceny v průběhu 24-48 hodin. Tento mechanismus vyžaduje bakteriální replikaci, která začíná 6 hodin po infekci. Ciprofloxacin přidaný k buněčné linii 12 hodin po infekci usmrtí bakterie a zabrání apoptóze hostitelské buňky. (2,3,12).

Druhá cesta apoptózy při infekci makrofágové linie *F. tularensis* je závislá na aktivaci signální cesty přes p42/p44 MAPK a vyřazení antiapoptické signální cesty přes p38 MAPK. p42 a p44 MAP kinázy kontrolují buněčný růst a diferenciaci. K aktivaci dochází fosforylací threoninových a tyrozinových zbytků zejména 18-36 hodin po infekci. Toto zjištění bylo velmi překvapující, protože p42/p44 MAPK signální cesta je obecně považována za antiapoptickou (10). Zdá se, že aktivace p42/p44 MAPK souvisí se vznikem autofagozómu, kdy byla aktivace této kinázy popsána (9).

1.2.1.5 Signální cesty aktivované přes TLR

Receptory skupiny Toll

TLR mají stěžejní úlohu při detekci mikrobiální infekce během nespecifické imunitní reakce. U savců jsou tyto receptory schopné rozeznávat konzervativní produkty metabolismu bakterií, tzv. struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (PAMP), které jsou produkovány pouze mikroorganismy, jsou nezbytně důležité pro některou fyziologickou funkci mikroba a jsou typické pro určitou skupinu mikroorganismů. Jedná se např. o lipopolysacharidy buněčné stěny gram-

negativních bakterií, peptidoglykany, lipoteichovou kyselinu buněčné stěny gram-pozitivních bakterií, glykany bohaté na mannózu, flagelin nebo pilin (13,14).

TLR jsou využívány hlavně buňkami v místech vstupu patogenů do hostitelského organismu, nacházejí se např. u buněk imunitního systému (slezinné buňky, leukocyty, granulocyty, monocyty a makrofágy), dále u epitelálních buněk kůže, respiračního, intestinálního a urogenitálního traktu, kde tvoří prvotní ochrannou bariéru. Jejich aktivací dochází k syntéze prozánětlivých cytokinů a interferonů důležitých pro rozvoj nespecifické imunitní reakce a kostimulačních molekul, které umožní aktivaci T-buněk a specifické imunity (15).

TLR patří do rodiny transmembránových receptorů typu I, pro které je charakteristická extracelulární, na leucin bohatá doména LRR a intracelulární Toll/IL-1 receptorová doména TIR. Mezi transmembránové proteiny obsahující TIR doménu patří také receptory z rodiny IL-1, např. IL-1R nebo IL-18R (13).

První TLR byl objeven u octomilky, kde kontroluje vývoj dorzoventrální osy embryí a obranné reakce proti houbovým infekcím u dospělých jedinců. Dnes je u savců známo alespoň deset různých TLR, které mají různé funkce v rámci nespecifické imunity. TLR ligandy se liší strukturou i původem, většinou jde o PAMP. Jejich asociace s extracelulární doménou TLR vede ke konformační změně v cytoplazmatické části receptoru (13,31).

Jako první savčí TLR byl popsán **TLR4**. Je využíván hlavně buňkami imunitního systému včetně makrofágů a dendritických buněk. Jeho hlavním ligandem je LPS gram-negativních bakterií, dále pak lipoteichová kyselina a protein teplotního šoku HSP60. Transmembránový signál je přenášen pomocí komplexu molekul CD14, TLR4 a MD-2. MD-2 je také nezbytný pro expresi TLR4 na povrchu buňky. **TLR2** rozpoznává velké množství mikrobiálních produktů, např. peptidoglykany gram-pozitivních bakterií, lipoproteiny, lipoarabinomannan mykobakteriální buněčné stěny, buněčnou stěnu kvasinek a další. S **TLR1** a **TLR6** je schopen vytvářet heteromerní struktury, každá z nich je určena k rozpoznávání rozdílných ligandů. **TLR3** je častý u dendritických buněk, slouží jako receptor pro dvouřetězcovou RNA produkovanou virem v určité fázi jejich infekčního cyklu. **TLR5** rozeznává flagelin, protein bakteriálního bičíku. Pro **TLR7** zatím nebyly popsány specifické mikrobiální produkty, tyto receptory mohou být stimulovány malými antivirovými molekulami se strukturou nukleosidu (imiquimod a resiquimod). Předpokládá se, že tyto ligandy jsou spojeny

i s aktivací lidských **TLR8**. Ligandem pro **TLR9** je nemetylovaná bakteriální DNA (13, 30,31).

Signální cesty aktivované přes TLR4

Navázání LPS na TLR4 může vést k několika klinickým jevům včetně endotoxinového šoku, zánětu, endotoxinové tolerance a imunitní odpovědi typu Th1, které jsou zprostředkované masivní produkcí prozánětlivých cytokinů a chemokinů. LPS je také schopen indukovat velké množství antivirových proteinů a chemokinů, které jsou regulovány interferony třídy I a II. Transkripce těchto cytokinů a chemokinů je řízena transkripčními faktory NF- κ B a IRF-3 (30).

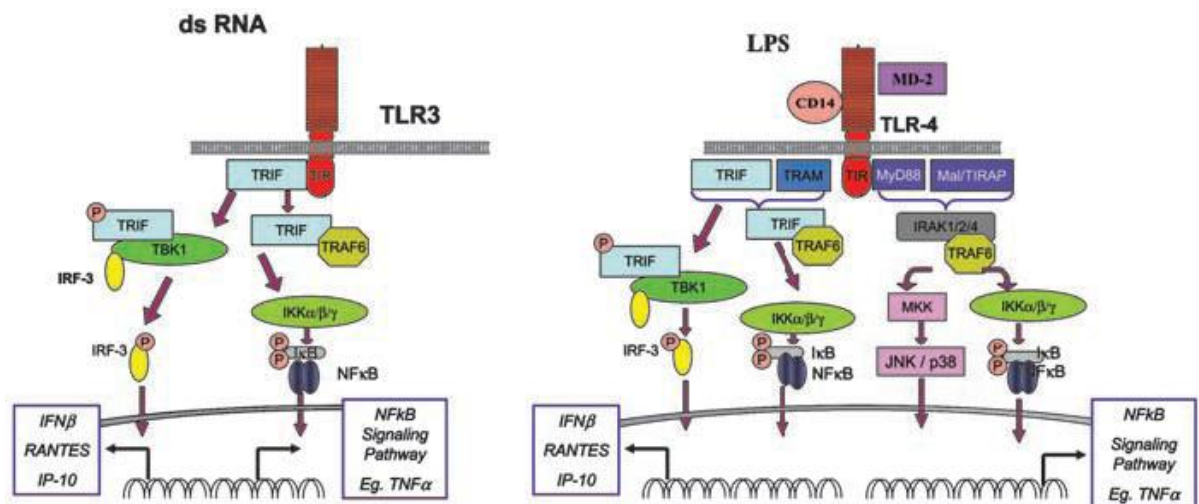
Dosud byly popsány čtyři adaptorové molekuly obsahující doménu TIR, které se podílejí na signalizaci přes TLR4: MyD88 a MAL/Tirap pro signální cestu závislou na MyD88, vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B a expresi genů pro TNF- α , IL-1, IL-12, IL-8 atd., dále Trif/TICAM-1 a Tram/TICAM-2 zprostředkovávající signalizaci vedoucí k transkripčnímu faktoru IRF-3 a expresi genů pro IFN- β , IP-10, Rantes, iNOS atd. signální cestou nezávislou na MyD88 (30, 31).

Důležitými složkami **MyD88-dependentní** signální cesty jsou adaptorové proteiny MyD88, TOLLIP a TRAF6 a kináza IRAK. MyD88 obsahuje dvě interaktivní domény: TIR doména na C-konci se váže na TIR doménu TLR nebo IL-1R, doména na N-konci se váže na doménu kinázy IRAK. IRAK je fosforylována a váže se na TRAF6, který přes TAK1 aktivuje NF- κ B a přes MKK6 potom JNK a p38 MAP kinázu (13).

Adaptorový protein TIRAP neboli Mal se napojuje na TIR doménu TLR4. S MyD88 vytváří dimerní strukturu, která asociuje s kinázou IRAK a vede až k aktivaci NF- κ B, JNK a p38 MAPK. Tento adaptorový protein není specifický pouze pro signální cesty u TLR4, ale podílí se také na signalizaci u TLR2. Úloha adaptorového proteinu TOLLIP ještě nebyla zcela objasněna. Vytváří komplex s IRAK, který se rozpadá po autofosforylaci IRAK. TOLLIP má schopnost utlumit aktivitu IRAK a takto zabránit aktivaci NF- κ B při stimulaci IL-1 a ligandy pro TLR2 a TLR4, což by mohlo být využíváno během zánětu a infekce k omezení produkce prozánětlivých mediátorů. (15).

Pouze u TLR4 byl popsán adaptorový protein TRAM neboli TICAM-2 stěžejní pro spuštění **MyD88-independentní** signální cesty. TRAM působí na TRIF neboli TICAM-1. TRIF propojuje obě signální cesty asociací s TRAF6, jehož aktivace vede až

k transkripčnímu faktoru NF- κ B. Druhou variantou je fosforylace TRIF vedoucí k aktivaci IRF-3 kináz: IKK-i a Tbk-1 a následné fosforylaci a aktivaci transkripčního faktoru IRF-3. Fosforylace a aktivace transkripčního faktoru IRF-3 vedoucí ke genové expresi IFN- β může být zprostředkována také přes TLR3 vlivem virové infekce nebo dvouřetězcové RNA. Adaptorovým proteinem této signální cesty je pouze TRIF/TICAM-1 (14-16).



Obr. 1 Signální cesty pro TLR3 a TLR4 (16)

Za nejdůležitější transkripční faktory zahrnuté v TLR-zprostředkovaných signálních cestách jsou považovány NF- κ B a IRF-3, jejichž aktivace vede k expresi mnoha genů včetně genů pro cytokiny a chemokiny (16).

1.2.1.6 Vliv *F. tularensis* na signální cesty aktivované přes TLR

IFN- γ a TNF- α mají stěžejní úlohu při aktivaci makrofágů a během kontroly infekce (2). Dosud nebyl popsán žádný intracelulární patogen schopný množení v makrofázích aktivovaných IFN- γ . Také FCP v aktivovaných makrofázích vyžívá během první hodiny po pohlcení bakterie až do fáze fagolyzozómu s detekovatelným ukazatelem Cathepsinem D. *F. tularensis* neuniká do cytoplazmy, membrána fagozómu je nedotčená i 24 hodin po infekci (5).

Intracelulární bakterie vyvinuly mnoho způsobů, jak zeslabit antimikrobiální efekt fagocytů. Signální cesty pro produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů jsou

ideálním cílem, protože jediná chyba znemožní expresi stovek genů pro antimikrobiální efektorové molekuly - cytokiny a chemokiny, včetně TNF- α , IL-1, IL-12, IP10 a INF- β . Porušení signální cesty vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B bylo pozorováno např. u druhů *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* a rodů *Salmonella* a *Yersinia* (2, 18).

Inhibiční mechanismus využívaný *F. tularensis* zatím nebyl pozorován u jiné intracelulární bakterie. Extracelulární *F. tularensis* interaguje s povrchovými molekulami monocytů, dochází k aktivaci signálních cest vedoucích k transkripčním faktorům MAPK a NF- κ B a k následné sekreci prozánětlivých cytokinů, např. TNF- α , IL-1, IL-12. Porušení signalizace se objevuje až po internalizaci *F. tularensis*. Dochází k zablokování signálních cest vedoucích k NF- κ B, p38 a c-Jun a potlačení produkce TNF- α a IL-1. Signalizace přes TLR4 a TLR2 zůstává zablokována i po přidání agonistů těchto receptorů *E. coli* LPS nebo BLP. Důležitým virulenčním faktorem je bakteriální stresový protein o velikosti 23 kDa, který se uplatňuje během adaptace bakterie v intracelulárním prostředí. Nezanedbatelnou úlohu zde mají také proteiny kódované v FPI, zejména IglC. Přesné místo zásahu *F. tularensis* do signálních cest makrofágů se zatím nepodařilo lokalizovat. Signální cesty nebyly ovlivněny stimulací *F. tularensis* LPS, který má sníženou toxicitu v důsledku své neobvyklé struktury (2,18).

Během 30 minut po infekci makrofágů *F. tularensis* dochází k aktivaci Akt. Akt je proteinová kináza, která má vliv mimo jiné na průběh buněčného cyklu, přežívání buněk, genovou transkripci závislou na NF- κ B a buněčnou migraci. V závislosti na podnětu může Akt aktivovat nebo inhibovat transkripční faktor NF- κ B. Při stimulaci PDGF nebo TNF- α dochází k aktivaci NF- κ B a k produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů a zároveň k inhibici produkce protizánětlivého cytokinu IL-10. Při stimulaci vyvolané LPS dochází k inhibici NF- κ B. Její aktivita je zřejmě regulována regulátorem FPI MglA (19).

1.2.2 Interakce s B-buňkami

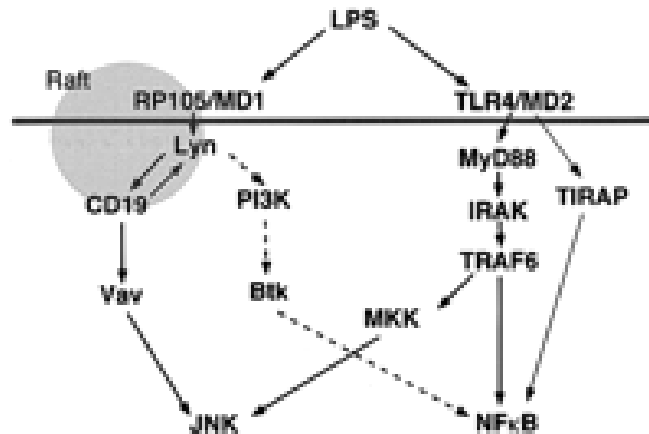
1.2.2.1 Úloha B-buněk v průběhu časně imunitní odpovědi k *F. tularensis*

Úloha B-buněk během vytváření imunity byla tradičně přisuzována tvorbě protilátek. Při infekci intracelulárními patogeny mají ale protilátky pouze malý význam

vzhledem k lokalizaci patogenu uvnitř buňky, která ho chrání před účinným navázáním protilátek (1).

Zvláštností pozorovanou u myši infikovaných *F. tularensis* LVS je vytvoření silné ochrany proti letální dávce v krátké době po podání subletální dávky: myši po i.d. podané subletální dávce 1×10^3 LVS jsou schopné přežít letální i.p. nebo i.v. podanou dávku více než 10^6 násobku LD_{50} po 3 dnech od prvotní subletální dávky. Takto vzniklá ochrana je nespecifická, nezávislá na T-buňkách a trvá přibližně 1 měsíc. Důležitou roli zde nejspíše hrají B-buňky - nezávisle na tvorbě protilátek - produkcí rozpustných mediátorů s účinkem místním nebo systémovým. B-buňky jsou schopné sekretovat mnoho mediátorů, např. IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha\beta$ a IL-12, ale ne IFN- γ . IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha\beta$ jsou důležité cytokiny pro regulaci produkce IFN- γ a aktivaci makrofágů během intracelulární infekce včetně LVS. B-buňky by mohly přímo interagovat s jinými buňkami, např. s NK-buňkami, jejichž aktivace vede ke zvýšené produkci IFN- γ . Také by mohly poskytovat mediátory, které během LVS infekce nejsou jinými buňkami produkovány, nebo produkcí cytokinů výrazně zesilovat cytokinovou odpověď na LVS infekci. Protilátky mají zřejmě omezenou roli během dlouhodobé ochrany proti LVS (1,25,26).

Silným stimulantem B-buněk je LPS gram-negativních bakterií. B-buňky exprimují na svém povrchu 2 receptory pro LPS z rodiny TLR: TLR4 a RP105, jejichž aktivací se spustí dvě nezávislé signální cesty. Receptor RP105 je exprimován pouze na B-buňkách a dendritických buňkách. Navázáním LPS na RP105 dochází k fosforylaci tyrozinového zbytku proteinu CD19, aktivaci Lyn kinázy, fosforylaci proteinu Vav a následné aktivaci JNK. Cestou nezávislou na CD19 přes Lyn kinázu a Btk může také docházet k aktivaci NF- κ B. Signální cesta závislá na adaptorovém proteinu MyD88 vede přes TLR4, IRAK a TRAF6 k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (27).



Obr. 2 Potenciální signální cesty aktivované LPS u B-buněk (27)

Proliferace B-buněk a tvorba polyklonálních protilátek po infekci gram-negativními bakteriemi je ovlivňována enzymem AOA_H hostitelské buňky. Lipid A LPS je tvořen glukosamin disacharidem s hydroxyacylovými řetězci v polohách 2, 3, 2' a 3', které mohou být dále acylovány např. laurátem, myristátem nebo palmitátem za tvorby acyloxyacylového řetězce. AOA_H selektivně odstraňuje sekundární acyly z LPS, vzniká částečně deacylovaný LPS s účinností přibližně 0,2-1 % v porovnání s plně acylovaným LPS. Deacylaci lze detekovat po mnoha hodinách až několika dnech, během kterých může LPS aktivovat nespecifické imunitní reakce. AOA_H neovlivňuje syntézu protilátek závislou na T-buňkách, kdy LPS indukuje expresi kostimulačních molekul makrofágy a dendritickými buňkami. Genovou sekvencí podobnou AOA_H lze nalézt u všech obratlovců s výjimkou ryb, enzym je produkován hlavně monocyty a makrofágy, dendritickými buňkami, neutrofily a epiteliálními buňkami dřeně ledvin (21).

1.2.2.2 Interakce B-buněk s *F. tularensis*

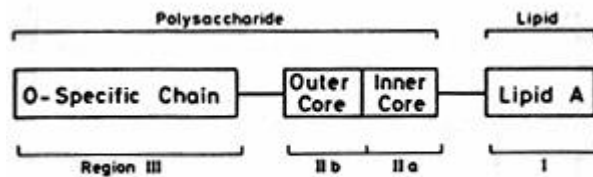
Přímé interakce mezi intracelulárními patogeny a B-buňkami zatím nebyly příliš zkoumány. Menon a kol. (2003) popsali schopnost intracelulární bakterie *Listeria monocytogenes* infikovat a zabít B-buňky jako jednu z možných strategií zahájení infekce. *L. monocytogenes* se adherovala na povrch myších i lidských B-buněk, způsobila ztrátu některých povrchových molekul hostitelských buněk a vytvořila póry v membráně. V důsledku toho došlo k nabobtnání B-buněk, rozpadu buněčné membrány a apoptóze (28).

Nedávno byla schopnost přímé interakce s B-buňkami objevena i u *F. tularensis*. S použitím transmisní elektronové mikroskopie byly sledovány myší (A20), lidské (Ramos) B-buňky a slezinné buňky. Do 24 hodin po infekci došlo k infikaci více než 20 % buněk. Živé bakterie způsobily apoptózu u buněčné linie Ramos a slezinných myších CD19+ buněk. Po 24 hodinách prodělalo apoptózu 30 %, po 48 hodinách 70 % buněk bez ohledu na použitý kmen *F. tularensis*. U neinfikovaných buněk a buněk infikovaných usmrcenou *F. tularensis* se v obou časových intervalech vyskytovalo okolo 10 % apoptických buněk (29).

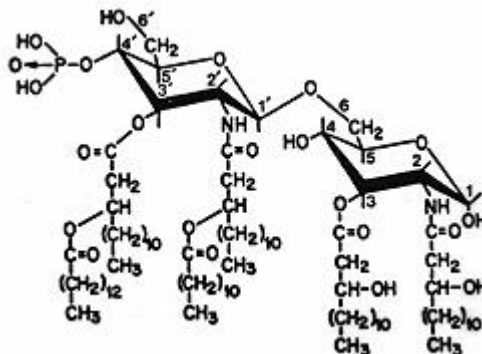
1.2.3 Signální cesty ovlivněné LPS

1.2.3.1 *F. tularensis* LPS

Lipopolysacharid tvoří důležitou složku vnější membrány gram-negativních bakterií. Interakce komplexu LPS a proteinu MD-2 s TLR4 makrofágů a buněk endotelu spouští signální kaskády vedoucí k uvolnění prozánětlivých cytokinů (3). Je tvořen komplexem amfifilních molekul o velikosti přibližně 10 kDa tvořících 3 základní části: lipid A, ovlivňující toxicitu LPS, R polysacharid neboli „core“ R antigen a O polysacharid neboli somatický O antigen, určující imunologickou specificitu. Lipid A je tvořený fosforylovaným N-acetylglukosaminovým dimerem s připojenými šesti až sedmi nasycenými mastnými kyselinami, které jsou navázány přímo na dimer nebo esterovou vazbou na 3-hydroxy mastnou kyselinu. Struktura lipidu A se příliš neliší mezi jednotlivými gram-negativními bakteriemi. R polysacharid je na N-acetylglukosamin napojen v poloze 6 a je tvořen krátkými řetězci sacharidů. Mezi neobvyklé sacharidy patří heptóza a 2-keto-3-deoxyoktanová kyselina, která je přítomna ve všech LPS, v jiných sloučeninách se nevyskytuje. O polysacharid je navázán na R polysacharid a je tvořen až 40x se opakujícími podjednotkami 3-5 sacharidů. Mezi jednotlivými bakteriálními druhy i kmeny se vyskytuje velká rozmanitost sacharidů obsažených v O polysacharidu. Hlavně koncové sacharidy určují imunologickou specificitu O polysacharidu daného kmene (20).



Obr. 3 Obecná struktura LPS (20)



Obr. 4 Struktura lipidu A LPS *S. typhimurium*, *S. minnesota* a *E. coli* (20)

F. tularensis LPS má zvláštní strukturu. Na lipidu A jsou navázány neobvykle dlouhé mastné kyseliny, chybí zde fosforylace, α -glukosamin v poloze 3 není acylován. Ve struktuře se také objevují neobvyklé β -(1-6)glukany (23).

1.2.3.2 Indukce signálních cest

LPS je životně důležitý pro gram-negativní bakterie z hlediska strukturního i funkčního. Je také jedním z nejúčinnějších aktivátorů imunitního systému. Jeho rozpoznání monocyty a makrofágy vede k aktivaci signálních cest, uvolnění prozánětlivých mediátorů (např. TNF- α , IL-6, IL-1 β) a eliminaci bakterie. Velké množství LPS nebo LPS uvolněný do krevního oběhu může způsobit systémovou reakci vedoucí k poruše funkcí některých orgánů, šoku a smrti (22).

E. coli LPS je strukturně velmi blízký optimální struktuře umožňující maximální aktivaci TLR4, proto je považován za nejúčinnější LPS pro aktivaci monocytů a makrofágů (22).

F. tularensis LPS není schopen aktivovat makrofágy k produkci TNF- α a NO, pre-B-buňky k expresi povrchových imunoglobulinů a buňky kostní dřeně k expresi

vazebných míst pro LPS nebo se tak děje v koncentraci 100-1000x větší než u LPS ostatních gram-negativních bakterií. Příčinou je zřejmě jeho neobvyklá struktura (24).

2 Experimentální část

2.1 Použitý materiál

2.1.1 Buněčné linie, bakterie

A20 – myší B-buněčná linie (ATCC) kat. č. TIB-208

J774A.1 – myší monocyto-makrofágová linie (ATCC) kat. č. TIB-67

Francisella tularensis LVS 155 – live vaccine strain (ATCC) kat. č. 29684

2.1.2 Primery pro RT-PCR

β -actin (Invitrogen)

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

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

β_2 -microglobulin (Invitrogen)

S: 5'- GGC TCG CTC GGT GAC CCT AGT CTT T – 3'

As: 5'- TCT GCA GGC GTA TGT ATC AGT CTC A – 3'

IFN- β (Generi-Biotech)

S: 5'- ATG GAA AGA TCA CCT ACA G – 3'

As: 5'- CCT TTG CAC CCT CCA GTA ATA GC – 3'

IP-10 (Generi-Biotech)

S: 5'- GCT GTC CTA GCT CTG TAC T – 3'

As: 5'- ACT TTA ACT ACC CAT TGA TAC ATA CTT – 3'

IRF-3 (Generi-Biotech)

S: 5'- AGT TTA TGC CGC CAT CAC – 3'

As: 5'- GTG GCC TCT GGT ATC AGT – 3'

MyD88 (Generi-Biotech)

S: 5'- CTG TGT CTG GTC CAT TGC – 3'

As: 5'- GGA ATC AGT CGC TTC TGT – 3'

Tbk-1 (Generi-Biotech)

S: 5'- CGC TAA CTA ATC AGT GTT TCG – 3'

As: 5' - CGA AGG CCA CCA TCC ATT G – 3'

TLR4 (Generi-Biotech)

S: 5' - GCA ATG TCT CTG GCA GGT GTA – 3'

As: 5' - CAA GGG ATA AGA ACG CTG AGA – 3'

TNF- α (Invitrogen)

S: 5' - AGC CCA CGT AGC AAA CCA CCA A – 3'

As: 5' - ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T – 3'

2.1.3 Média, roztoky a chemikálie

2.1.3.1 Média, roztoky a chemikálie pro RT-PCR

0,1M DTT (Invitrogen) kat. č. 1172261

10x PCR Rxn Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen) kat. č. 1170077

1 kB Plus DNA Ladder 250 μ g / 1 μ g / μ l (Invitrogen) kat. č. 10787-018

50mM MgCl₂ (Invitrogen) kat. č. 1169618

5x First Strand Buffer (Invitrogen) kat. č. 1172260

acidický BSA 1 mg / ml – příprava (500 μ l) ze 50 μ l zásobního roztoku BSA 10 mg / ml a 450 μ l DEPC vody

BSA 10 mg / ml (Invitrogen) kat. č. 1272858

dATP Solution 100mM (Invitrogen) kat. č. 1190867

dCTP Solution 100mM (Invitrogen) kat. č. 1190743

dGTP Solution 100mM (Invitrogen) kat. č. 1190744

dNTP 10mM – příprava (500 μ l) z 50 μ l zásobního roztoku dGTP 100mM, 50 μ l zásobního roztoku dCTP 100mM, 50 μ l zásobního roztoku dATP 100mM, 50 μ l zásobního roztoku dTTP 100mM a 300 μ l DEPC vody

dTTP Solution 100mM (Invitrogen) kat. č. 1190745

Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Fermentas) kat. č. 2401

Oligo Primers (Invitrogen) kat. č. 18418-012

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

RNase OUT Ribonuclease Inhibitor (Recombinant) (Invitrogen) kat. č. 1288908

Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) kat. č. 1184119

Taq DNA Polymerase (Recombinant) (Fermentas) kat. č. 4834 a Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) kat. č. 11615-010

Trackit Cyan/Orange Loading Buffer (Invitrogen) kat. č. 10482-028

2.1.3.2 Ostatní média, roztoky a chemikálie

0,5% roztok trypanové modři v PBS

0,5x TBE pufr - příprava z 5x TBE pufru

10x PBS – příprava (1 l) z 80 g NaCl, 20 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄·12H₂O, 2 g KH₂PO₄, doplnit do 1 l deionizovanou vodou

10x FA gel buffer – příprava (100 ml) z 10 ml 10x FA gel running buffer, 2 ml 37% formaldehydu, 88 ml neionizované vody

10x FA gel running buffer – příprava z 200mM MOPS, 50mM Sodium acetate, 10mM EDTA, úprava pH na 7,0 hydroxidem sodným

14,3M β-mercaptoethanol (Sigma) kat. č. 200-464-6

5x TBE pufr – příprava (1 l) z 54 g TRIS, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0 (úprava pH kyselinou chlorovodíkovou), doplnit do 1 l neionizovanou vodou

Agarose For Routine Use (Sigma) kat. č. 232-731-8

Boric acid puriss. p. a. (Riedel-deHaën) kat. č. 10750

DEPC (Sigma) kat. č. D-5758 - zásobní roztok: 10% v 99,5% ethanolu; pracovní roztok: 0,1% DEPC v neionizované vodě (inkubovat nejméně 12 hodin při 37 °C v otevřené láhvi, autoklávovat)

EDTA-disodium-salt solution 0,5M (Serva) kat. č. 16024

Ethanol 75% - příprava (100 ml) ze 78,13 ml ethanolu 96% a 21,87 ml DEPC vody

Ethanol čistý 96% (P-Lab a.s.) kat. č. E 02301

Ethidium bromid 10 mg / ml (Sigma) kat. č. 214-984-6

Formaldehyde Solution (Fluka) kat. č. 47608

Glycerin (Penta) šarže 040304

Chloroform (Penta) šarže 060503

Isopropylalkohol (Fluka) kat. č. 59304

Kultivační médium Dullbeco (with glutamax) + 10% FCS (Gibco) kat. č. 12192

Kultivační pevné půdy McLeod – příprava z Difco GC Medium base, Gbl Hemoglobin Bovine, Isovitalox Enrichment

Kyselina chlorovodíková 35% (Kulich) šarže 12.03.2004

LPS (*E. coli*) – zásobní roztok – 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace 1 µg/ml (Sigma) kat. č. L2880

LPS (*F. tularensis*) – zásobní roztok – 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace 1 µg/ml (Anders Sjöstedt, Univerzita Umea, Švédsko)

PBS sterilizovaný – příprava z 10x koncentrovaného PBS, sterilizace autoklávem

RLT pufr (Qiagen) kat. č. 12194852

RPE pufr (Qiagen) kat. č. 12196461

RW1 pufr (Qiagen) kat. č. 12193563

TRIS (Serva) kat. č. 15660

TRIzol (Invitrogen) kat. č. 15596-026

2.1.4 Přístroje a pomůcky

6jamkové panely na infekci (TPP)

Automatické pipety 10, 100 a 1000 µl (Eppendorf)

Bakteriální kličky (TPP)

Bio Box ABX 200 (Unimak)

Centrifuga BR4i (Thermo)

Centrifuga Pico (Heraeus)

Denzitometr C08000 (WPA Bioware)

Elektroforetická vana Mupid (Cosmo bio co.)
Forma na gely, hřebínky na gely
Kádinky
Kolonky pro izolaci RNA Qia shredder spin column
Kolonky pro izolaci RNA RNeasy mini column
Kultivační láhve (TPP)
Kyvety (Scholler)
Latexové rukavice (Hartmann)
Mikroskop inverzní IDM (Meopta)
Mikroskop světelný binokulární (Amplival)
Pipety 2, 5, 10 ml (Biotech)
Plastové zkumavky na PCR (Eppendorf)
Plastové zkumavky s víčkem o objemu 1,5 ml (Eppendorf)
Počítací komůrka dle Bürkera (Meopta)
Spektrofotomert Spekol (Helios)
Sterilní škrabky (Lukasterik)
Špičky 10, 100 a 1000 μ l (Eppendorf)
Termocykler PTC-200 (Biotech)
Třepačka MS2 (Ika)
Zkumavky na infekci o objemu 15 ml (TPP)

2.2 Pracovní postup

2.2.1 Příprava buněčné suspenze

2.2.1.1 Zamrazování buněčných suspenzí

Zamrazovat lze pouze kvalitní buněčnou kulturu s životností více než 90 %.

Kultivační láhev obsahující buněčnou kulturu v kultivačním médiu jsme zkontrolovali inverzním mikroskopem. Hodnotili jsme hustotu a kvalitu buněk a čistotu média. Po zhodnocení jsme provedli pasážování buněk (viz kapitola 2.2.1.3.) a odebrali 10 µl na stanovení koncentrace a životnosti buněk (viz kapitola 2.2.1.4.).

Buněčnou suspenzi jsme ve sterilním boxu přenesli z kultivační láhve do zkumavky. Zkumavku jsme centrifugovali 5 minut při 300 g. Vzniklý supernatant jsme odstranili, k buněčnému peletu jsme přidali zamrazovací médium (na 1×10^6 buněk připadá 1 ml zamrazovacího média), roztřepali a přenesli pipetou do kryozkumavek, které jsme popsali (druh buněčné kultury, datum zamrazení, počet pasáží). Pečlivě uzavřené kryozkumavky jsme vložili do polystyrenového obalu a rychle zamrazili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den jsme kryozkumavky přenesli do mrazicího boxu s kapalným dusíkem. O týden později jsme zkontrolovali kvalitu zamrazení: jednu kryozkumavku jsme rozmrazili (viz odstavec Rozmrazování buněk), 24 hodin kultivovali v termostatu při $37\text{ }^{\circ}\text{C} / 5\text{ \% CO}_2$ (viz kapitola 2.2.1.3.) a za 24 hodin jsme určili koncentraci a životnost buněk (viz kapitola 2.2.1.4.).

2.2.1.2 Rozmrazování buněčných suspenzí

Kryozkumavku obsahující zamrazenou buněčnou kulturu jsme vyjmuli z mrazicího boxu s kapalným dusíkem. Rychle jsme ji rozmrazili pod tekoucí teplou vodou. Ve sterilním boxu jsme kryozkumavku otevřeli, její obsah přenesli pipetou do sterilní zkumavky a přidali malé množství kultivačního média. Zkumavku jsme centrifugovali 5 minut při 300 g. Vzniklý supernatant obsahoval pro buňky toxické kryoprotektivum DMSO (dimethylsulfoxid) ze zamrazovacího média. Supernatant jsme odstranili, k buněčnému peletu přidali malé množství kultivačního média a roztřepali. Buněčnou suspenzi jsme přenesli pipetou do čisté sterilní kultivační láhve s obsahem dna 25 cm^2 , přidali 10 ml kultivačního média a uložili do termostatu. V termostatu jsme

kultivační láhev pootevřeli a kultivovali 24 hodin při teplotě 37 °C / 5 % CO₂. Za 24 hodin jsme z buněčné kultury odebrali 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (viz kapitola 2.2.1.4.).

2.2.1.3 Kultivace a pasážování buněk A20 a J774

A20

Buňky A20 patří mezi suspenzní buněčné kultury.

Buněčnou kulturu v kultivační láhvi jsme zkontrolovali pod inverzním mikroskopem. Hodnotili jsme hustotu a kvalitu buněk a čistotu média. Ve sterilním boxu jsme uzavřenou kultivační láhev řádně protřepali, aby se jednotlivé buňky od sebe oddělily.

Pipetou jsme asepticky odebrali 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (viz kapitola 2.2.1.4.). V kultivační láhvi jsme ponechali pouze takové množství buněčné kultury, které je potřebné pro další růst. K buněčné kultuře jsme přidali kultivační médium (viz tabulka níže). Kultivační láhev jsme uzavřeli, otřeli mulem namočeným ve 2% roztoku persterilu, vložili do termostatu, pootevřeli a nechali inkubovat při 37 °C / 5 % CO₂.

J774

Buňky J774 patří mezi adhezní buněčné kultury.

Buněčnou kulturu v kultivační láhvi jsme zhodnotili pod inverzním mikroskopem stejně jako u buněk A20. Ve sterilním boxu jsme kultivační láhev otevřeli a sterilní škrabkou opatrně oškrabali přilnuté buňky z podkladu tak, aby nedošlo k jejich poškození (buňky se musí seškrabávat v médiu) a zároveň došlo k odstranění všech buněk. Kultivační láhev jsme zavřeli a buněčnou suspenzi řádně protřepali, aby se buňky rozvolnily ze shluků. Pipetou jsme asepticky odebrali 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (viz kapitola 2.2.1.4.). V kultivační láhvi jsme nechali pouze takové množství buněčné kultury, které je potřebné pro další růst. K buněčné kultuře jsme přidali kultivační médium (viz tabulka 1). Kultivační láhev jsme uzavřeli, otřeli mulem namočeným ve 2% roztoku persterilu, vložili do termostatu, pootevřeli a nechali inkubovat při 37 °C / 5 % CO₂.

Tab. 1 Velikosti kultivačních lahví, množství buněčné kultury a množství kultivačního média pro kultivaci a pasážování buněčných kultur.

Obsah dna kultivační lahve (cm ²)	Množství buněčné kultury pro další růst (buněk)	Množství kultivačního média (ml)
150	3-4 x 10 ⁶	do 50
75	1-2 x 10 ⁶	do 20
25	0,5-1 x 10 ⁶	do 10

2.2.1.4 Určení koncentrace a životnosti buněk

Z protřepané (u adherující buněčné kultury také řádně seškrabané) buněčné suspenze jsme asepticky odebrali 10 µl, smíchali s 10 µl trypanové modří a směsí jsme naplnili Bürkerovu počítací komůrku. Pod světelným mikroskopem jsme počítali buňky uvnitř a na obvodu dvou zvolených stran ve 25 čtvercích. Zjišťovali jsme počet živých a počet mrtvých buněk. Mrtvé buňky byly zabarveny modře. Součet jsme provedli dvakrát.

Určení životnosti

Ze zjištěných údajů jsme vypočítali průměrný počet živých a průměrný počet mrtvých buněk. Jejich součtem jsme získali průměrný počet všech buněk. Životnost (v %) je dána podílem průměrného počtu živých buněk a průměrného počtu všech buněk. Měla by se pohybovat v rozmezí 95-99 %.

Určení koncentrace

Množství buněk v 1 ml suspenze jsme vypočítali podle vzorce:

průměrný počet živých buněk x ředění trypanovou modří x koeficient Bürkerovy komůrky

ředění trypanovou modří..... 2

koeficient Bürkerovy komůrky..... 10 000

2.2.1.5 Příprava buněčné suspenze pro infekci

Z protřepané (u adherující buněčné kultury také řádně seškrabané) buněčné suspenze jsme asepticky odebrali 10 μ l, smíchali s 10 μ l trypanové modří a určili koncentraci a životnost buněk (viz kapitola 2.2.1.4.). Z údajů v protokolu jsme zjistili celkový počet buněk potřebných pro infekci. Podle zjištěné koncentrace buněk v 1 ml jsme vypočítali objem buněčné suspenze odpovídající potřebnému celkovému počtu buněk. Daný objem buněčné suspenze jsme asepticky pipetou odebrali z kultivační láhve, přemístili do sterilní zkumavky a centrifugovali 7 minut při 300 g . Poté jsme odstranili supernatant. Pelet jsme roztřepali a doplnili kultivačním médiem do objemu potřebného pro infekci.

2.2.2 Příprava bakteriální suspenze

Z údajů v protokolu (MOI = 500, O.D. = 1,0) jsme vypočítali celkový objem bakteriální suspenze a celkový počet bakterií potřebný pro infekci.

Na 2 plotny McLeod jsme masivně naočkovali bakterii *F. tularensis* LVS. Plotny jsme vložili do termostatu a inkubovali 24 hodin při 37 °C.

Za 24 hodin jsme plotny vyjmuli z termostatu. Ve sterilním boxu jsme bakteriální kličkou opatrně setřeli z plotny část bakteriální kultury. Kličku jsme otírali o suchou stěnu zkumavky obsahující 4 ml PBS tak, aby na stěně nezůstaly žádné shluky bakterií. Poté jsme kličku navlhčili v obsahu zkumavky a rozetřenou bakteriální suspenzi postupně smyli do PBS. Zkumavku s bakteriální suspenzí jsme vložili do otvoru v přístroji na měření optické denzity WPA Bioware. Postup jsme opakovali do dosažení optické denzity přibližně 1,0 (měřená oproti 4 ml PBS), která odpovídá koncentraci 5×10^9 bakterií v 1 ml PBS.

Bakteriální suspenzi s optickou denzitou 1,0 jsme pipetou rozplnili po 1 ml do 4 plastových zkumavek s víčkem. Suspenzi jsme centrifugovali 5 minut při 8 000 g za teploty 4 °C. Vzniklý supernatant jsme odstranili do roztoku dezinfekce, pelet resuspendovali a do každé zkumavky přidali 200 μ l kultivačního média.

2.2.3 Výsev a odečet CFU

Provádí se titrací desítkovou řadou.

Do 8 plastových zkumavek s víčkem jsme napipetovali 450 μ l PBS, zkumavky jsme označili řadou 10^{-1} až 10^{-8} . Do zkumavky s označením 10^{-1} jsme přenesli pipetou 50 μ l buněčné suspenze s optickou denzitou přibližně 1,0. Novou špičkou jsme suspenzi promíchali, odebrali 50 μ l a přenesli do zkumavky s označením 10^{-2} . Stejným způsobem jsme postupovali v celé řadě. Ze zkumavky s označením 10^{-7} a 10^{-8} jsme odebrali po 50 μ l suspenze, přenesli na suché plotny McLeod a sterilní hokejkou opatrně roztírali do vsáknutí. Pracovali jsme duplicitně, spotřebovali jsme 4 plotny McLeod. Plotny jsme popsali, vložili do termostatu víčkem dolů a inkubovali 72 hodin při 37 °C.

Za 72 hodin jsme spočítali všechny kolonie narostlé na každé plotně. Koncentraci kolonií v 1 ml bakteriální suspenze jsme vypočítali podle vzorce:

počet kolonií na plotně x ředění 1 x ředění 2

ředění 1.....převrácená hodnota koncentrace (10^7 nebo 10^8)

ředění 2.....1000 μ l / 50 μ l = 20

2.2.4 Detekce genové exprese metodou RT-PCR

2.2.4.1 Infekce a stimulace buněk A20 a J774

Infekce buněk A20 a J774 č. 1

Podle kapitoly 2.2.1.5. jsme si připravili potřebné množství buněčné suspenze A20 a J774 o koncentraci 2×10^6 buněk / 1 ml. Podle kapitoly 2.2.2. jsme si připravili potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci 4×10^9 bakterií / 1 ml. Pracovali jsme duplicitně. Pro infekci obou buněčných linií jsme použili 6jamkové panely, potřebovali jsme celkem 8 jamek – 4 jamky pro buněčnou linii A20 a 4 jamky pro buněčnou linii J774.

Do 4 jamek jsme asepticky napipetovali po 1 ml suspenze buněčné linie A20, do 3 jamek (pro časové intervaly 3, 6 a 24hodin) jsme přidali po 250 μ l bakteriální suspenze (MOI = 500), jednu kontrolní jamku jsme neinfikovali. Panely jsme přikryli víčkem, vložili do termostatu a inkubovali 3 hodiny při 37 °C / 5 % CO₂.

Po 3 hodinách jsme panely vyjmuli z termostatu. Obsah jamek pro 3hodinový interval a kontrolních jamek jsme promíchali, asepticky pipetou odebrali do zkumavky o objemu 15 ml a centrifugovali 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali a přidali přibližně 10 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali, pipetou přenesli do sterilní plastové zkumavky s víčkem a přidali 1 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme úplně odstranili pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou. Zkumavky jsme pečlivě zavřeli a zamrazili na -80 °C.

Po 6 hodinách jsme postup zopakovali u jamek pro 6hodinový interval. Jamky pro 24hodinový interval jsme promíchali, přidali 2 ml kultivačního media a inkubovali po zbytek intervalu v termostatu při 37 °C / 5 % CO₂. Po 24 hodinách jsme postupovali stejně jako v předchozích intervalech. Suché pelety jsme nezamrazovali, ale použili je na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kitu (viz kapitola 2.2.4.2.).

Při infekci buněčné linie J774 jsme postupovali stejným způsobem. V každém intervalu jsme naadherované buňky opatrně seškrabali sterilní škrabkou a poté asepticky přenesli do zkumavky o objemu 15 ml.

Infekce a stimulace buněk A20 a J774 č. 2

Podle kapitoly 2.2.1.5. jsme si připravili potřebné množství buněčné suspenze A20 a J774 o koncentraci 5×10^6 buněk/ml. Podle kapitoly 2.2.2. jsme si připravili potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci 5×10^9 bakterií/ml. Použili jsme zásobní roztok LPS (*E.coli*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při infekci byla 1 µg/ml (1 µl zásobního roztoku v 1 ml kultivačního média). Použili jsme zásobní roztok LPS (*F.tularensis*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při infekci byla 1 µg/ml (1 µl zásobního roztoku v 1 ml kultivačního média). Pracovali jsme duplicitně.

A20

Při infekci buněk A20 jsme pracovali ve sterilních zkumavkách o objemu 15 ml.

Infekci jsme prováděli ve sterilním boxu. Celkem jsme potřebovali 8 zkumavek – 4 zkumavky pro 6hodinový interval a 4 zkumavky pro 24hodinový interval. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 2:

Tab. 2 Množství buněčné suspenze, kultivačního média, bakteriální suspenze a lipopolysacharidů použitých pro infekci buněčné linie A20.

Označení zkumavek	Množství buněčné suspenze (ml)	Množství kultivačního média (ml)	Množství bakteriální suspenze (μl)	Množství LPS (<i>E.coli</i>) (μl)	Množství LPS (<i>F.tularensis</i>) (μl)
A20 6h K	1,0				
A20 6h LVS	1,0		100,0		
A20 6h <i>E.coli</i> LPS	1,0			1,0	
A20 6h LVS LPS	1,0				1,0
A20 24h K	0,5	0,5			
A20 24h LVS	0,5	0,5	50,0		
A20 24h <i>E.coli</i> LPS	0,5	0,5		1,0	
A20 24h LVS LPS	0,5	0,5			1,0

K – kontrolní neinfikované buňky

LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS

E. coli LPS – buňky infikované *E. coli* LPS

LVS LPS – buňky infikované *F. tularensis* LPS

6h, 24h – časový interval infekce

Zkumavky jsme naplnili podle tabulky, nechali pootevřené, vložili do termostatu a inkubovali 6 hodin při 37 °C / 5 % CO₂.

Po 6 hodinách jsme zkumavky vyjmuli z termostatu. Do zkumavek pro 24hodinový interval jsme přidali 2 ml kultivačního media, zkumavky nechali pootevřené, vložili do termostatu a inkubovali při 37 °C / 5 % CO₂ po zbytek 24hodinového intervalu.

Zkumavky pro 6hodinový interval jsme centrifugovali 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali a přidali přibližně 10 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali, pipetou přenesli do sterilní plastové zkumavky s víčkem a přidali 1 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme úplně odstranili pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou. Zkumavky jsme pečlivě zavřeli a zamrazili na -80°C.

Po 24 hodinách jsme postupovali stejným způsobem. Suché pelety jsme nezamrazovali, ale použili je na izolaci RNA pomocí TriZolu (viz kapitola 2.2.4.2.).

J774

Při infekci buněk J774 jsme pracovali ve sterilních 6jamkových panelech.

Infekci jsme prováděli ve sterilním boxu. Celkem jsme potřebovali 8 jamek – 4 jamky pro 6hodinový interval a 4 jamky pro 24hodinový interval.

Do jamek pro 6hodinový interval jsme napipetovali po 1,0 ml kultivačního média, do jamek pro 24hodinový interval po 0,5 ml kultivačního média. Panely jsme přikryli víčkem, vložili do termostatu a nechali adherovat 2 hodiny při 37 °C / 5 % CO₂.

Po 2 hodinách jsme panely vyndali z termostatu LPS a doplnili do jednotlivých jamek kultivační médium, bakteriální suspenzi, *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS podle tabulky pro infekci buněk A20. Panely jsme přikryli víčkem, vložili do termostatu a inkubovali 6 hodin při 37 °C / 5 % CO₂.

Po 6 hodinách jsme panely vyndali z termostatu. Do jamek pro 24hodinový interval jsme přidali po 2 ml kultivačního média. Panely jsme uzavřeli víčkem, vložili do termostatu a inkubovali při 37 °C / 5 % CO₂ po zbytek 24hodinového intervalu.

V jamkách pro 6hodinový interval jsme sterilní škrabkou opatrně seškrabali buňky adherované na dno panelu. Sterilní špičkou jsme uvolněné buňky přenesli do sterilní zkumavky o objemu 15 ml a centrifugovali 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali a přidali přibližně 10 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali, pipetou přenesli do sterilní plastové zkumavky s víčkem a přidali 1 ml PBS. Centrifugovali jsme 7 minut při 300 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme úplně odstranili pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou. Zkumavky jsme pečlivě zavřeli a zamrazili na -80 °C.

Po 24 hodinách jsme postupovali stejným způsobem. Suché pelety jsme nezamrazovali, ale použili je na izolaci RNA pomocí TriZolu (viz kapitola 2.2.4.2.).

Infekce a stimulace buněk A20 a J774 č. 3

Postupovali jsme stejným způsobem jako u infekce buněk A20 a J774 č. 2 se dvěma výjimkami.

Po 6 hodinách inkubace v termoboxu jsme do jamek pro 24hodinový interval obsahujících buněčnou suspenzi stimulovanou *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS přidali kromě 1 ml kultivačního média také 1 µl zásobního roztoku příslušného lipopolysacharidu.

Pelety získané po promítí PBS jsme nevysušovali injekční stříkačkou s jehlou. Po odstranění supernatantu jsme k nim přidali 1 ml TriZolu, opakovaným protažením obsahu zkumavky pipetou jsme infikované buňky lyzovali a poté je zamrazili na -80 °C, v případě 24hodinového intervalu jsme pokračovali izolací RNA pomocí TriZolu (viz kapitola 2.2.4.2.).

2.2.4.2 Izolace RNA

Během všech postupů pracujících s RNA a cDNA jsme používali latexové rukavice, abychom předešli kontaminaci vzorků lidskou DNA.

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kitu

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kitu se provádí za laboratorní teploty, která nesmí být během centrifugace nižší než 20 °C. Doporučené množství pro tuto metodu je 3-4 x 10⁶ buněk.

K rozmraženým, suchým peletům, které jsme získali při infekci buněk č. 1, jsme ve sterilním boxu přidali směs RLT pufru a β-merkapt ethanolu (10 μl β-merkapt ethanolu na 1 ml RLT pufru). Obsah zkumavky jsme promíchali pipetou a způsobili tak lýzu buněk. Jednotlivé lyzáty jsme pipetou přenesli na kolonky Qia shredder spin column umístěné v plastových zkumavkách s víčkem o objemu 2 ml a centrifugovali 2 minuty při maximální rychlosti. K lyzáátům jsme přidali po 350 μl 70% ethanolu a obsahy zkumavek promíchali pipetou. 700 μl z každého vzorku jsme pipetou přenesli do kolonek Rneasy mini column umístěných v plastových zkumavkách s víčkem o objemu 2 ml. Zkumavky jsme opatrně zavřeli a centrifugovali 15 sekund při více než 8 000 g. Z plastových zkumavek s víčkem umístěných pod kolonkami jsme odstranili proteklý ethanol. Ke vzorkům na kolonkách jsme přidali po 700 μl RW1 pufru, zkumavky opatrně zavřeli a centrifugovali 15 sekund při více než 8 000 g. Plastové zkumavky s víčkem obsahující proteklý pufr jsme odstranili a nahradili čistými. Na kolonky jsme napipetovali po 500 μl RPE pufru, zkumavky opatrně zavřeli a centrifugovali 15 sekund při více než 8 000 g. Z plastových zkumavek s víčkem jsme odstranili proteklý pufr, na kolonky jsme znovu napipetovali po 500 μl RPE pufru a centrifugovali 2 minuty při více než 8 000 g. Kolonky RNeasy mini column jsme umístili na čisté plastové zkumavky s víčkem o objemu 1,5 ml, které jsou součástí kitu. Na membrány kolonek jsme napipetovali po 30 μl DEPC vody, zkumavky zavřeli a centrifugovali 1 minutu při více než 8 000 g. Poté jsme na membrány kolonek napipetovali ještě 15 μl DEPC vody, zkumavky zavřeli a centrifugovali 1 minutu při více než 8 000 g. Eluát z plastové zkumavky s víčkem jsme přemístili pipetou na kolonku, zavřeli zkumavku a centrifugovali 1 minutu při více než 8 000 g.

Poté jsme z každé zkumavky odebrali 5 μl RNA pro měření RNA na spektrofotometru (viz kapitola 2.2.4.3.). Zbývající RNA jsme zamrazili na -80 °C.

Izolace RNA pomocí TriZolu

K rozmraženým, suchým peletům, které jsme získali při infekci buněk č. 2, jsme ve sterilním boxu přidali 1 ml TRIzolu způsobujícího lýzu buněk. Obsah zkumavky jsme pomocí pipety roztřepali a inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě. V případě izolace RNA po infekci buněk č. 3 jsme provedli lýzu buněk TriZolem již během infekce, infikované buňky jsme rozmrazili a 5 minut inkubovali při laboratorní teplotě. Po 5 minutách jsme do každé zkumavky přidali 0,2 ml chloroformu, obsah jsme důkladně 15 sekund v ruce protřepali a inkubovali 2-3 minuty při laboratorní teplotě. Poté jsme zkumavky centrifugovali 15 minut při méně než 12 000 g při teplotě 4 °C. Po centrifugaci jsme získali 3 fáze: dolní, červeně zbarvená – tvořená fenolem a chloroformem, obsahující DNA a proteiny; mezifáze, bíle zbarvená – obsahující DNA; vrchní, bezbarvá – vodní fáze, obsahující RNA. Opatrně jsme odebrali přibližně 500 µl z vrchní vodní fáze tak, abychom neporušili mezifázi a převedli jsme ji do nové sterilní plastové zkumavky s víčkem. Do každé zkumavky jsme přidali 0,5 ml isopropylalkoholu (isopropylalkohol precipitoval přítomnou RNA), inkubovali 10 minut při laboratorní teplotě a centrifugovali 10 minut při méně než 12 000 g při teplotě 4 °C. Po centrifugaci jsme odstranili supernatant, pelet byl tvořený izolovanou RNA. Do každé zkumavky jsme přidali 1 ml 75% ethanolu na promytí RNA, obsah jsme opatrně protřepali a centrifugovali 5 minut při 7 500 g při teplotě 4 °C. Supernatant jsme pečlivě pipetou odstranili a pelety vysušili. Izolovanou RNA jsme rozpustili v 30 µl DEPC vody a inkubovali 10 minut při 56 °C v termobloku.

Poté jsme z každé zkumavky odebrali 5 µl RNA pro měření RNA na spektrofotometru (viz kapitola 2.2.4.3.) a 5 µl RNA pro měření kvality RNA na FA gelu (viz kapitola 2.2.4.3.). Zbývající RNA jsme zamrazili na -80 °C.

2.2.4.3 Stanovení koncentrace RNA

Měření RNA na spektrofotometru

Z izolované RNA v DEPC vodě jsme pipetou odebrali 5 µl do sterilní plastové zkumavky s víčkem a naředili DEPC vodou 100x (495 µl DEPC vody). Měřili jsme RNA na spektrofotometru v programu Nucleid acide 260/280. Z hodnoty absorbance při 260 nm jsme přepočtem zjistili koncentraci RNA v µg/µl vzorku. Z hodnoty poměru

absorbancí při 260 a 280 nm jsme zjistili čistotu RNA. Tato hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 1,7 – 2,0. Jako slepý vzorek jsme použili 0,5 ml DEPC vody.

Koncentrace RNA v $\mu\text{l/ml}$ jsme vypočítali podle následujícího vzorce:

absorbance při 260 nm x ředění x faktor

ředění100

faktor40

Měření kvality RNA na gelu

Připravili jsme si 1x FA gel running buffer:

10 ml 10x FA gel running bufferu

2 ml 37% formaldehydu

88 ml DEPC vody nebo neionizované vody

10x FA gel running buffer jsme již měli připravený do zásoby a zamražený na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:

200mM 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS)

50mM Sodium acetate

10mM EDTA

úprava pH na hodnotu 7,0 hydroxidem sodným

Připravili jsme si 1,2% agarózový gel:

0,48 g agarózy

4 ml 10x FA pufru

do 40 ml DEPC vody nebo neionizované vody

Chemikálie na 1,2% agarózový gel jsme zahřívali v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. Směs jsme nechali vychladnout na přibližně $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, přidali 0,65 ml

37% formaldehydu a 2 μ l ethidium bromidu, dobře promíchali a vylili do připravené vaničky na gely s hřebínkem. Ztuhlý gel jsme přibližně 30 minut equilibrovali v 1x FA gel running bufferu. Poté jsme gel umístili do elektroforetické vany naplněné 1x FA gel running bufferem, do jednotlivých jamek nanесли 3 μ l vzorku RNA smíšené s 1 μ l glycerolu a 1 μ l Loading Bufferu. Elektroforézu jsme prováděli při napětí 100 V po dobu 30 minut. Po skončení elektroforézy jsme gel hodnotili pod UV lampou.

Eukaryotická RNA může produkovat 2 silné rRNA bandy (28S-4,7 kbp a 18S-1,9 kbp), je také možný 5S rRNA band.

2.2.4.4 Syntéza cDNA

Při syntéze cDNA dochází k přepisu mRNA do cDNA.

Do Eppendorfových zkumavek s víčkem umístěných na ledu jsme napipetovali směs vzorků RNA a DEPC vody o celkovém objemu 7,5 μ l. Pro reakci jsme použili 2 μ g RNA od každého vzorku. Množství použité RNA v μ l jsme zjistili přepočtem z koncentrace RNA v μ g / μ l získané v kapitole 2.2.6.1. Ke každému vzorku jsme přidali 0,5 μ l Random primeru, který se váže na RNA v různých místech a tvoří kratší úseky cDNA. Směs jsme promíchali a inkubovali 5 minut při 95 °C v termocykleru.

Po 5 minutách jsme vzorky vyndali na led. Ke každému vzorku jsme přidali 22 μ l RT-mixu:

5,1 μ l DEPC vody

6,0 μ l 5x First Strand Bufferu

3,0 μ l DTT 0,1M

1,0 μ l RNase out Ribonuclease Inhibitor (40 U)

3,0 μ l ac. BSA 1 mg / ml

2,4 μ l dNTP 10mM

1,5 μ l Superscript RNase Reverse Transkriptase (400 U)

Vzorky jsme promíchali a inkubovali v termocykleru:

37 °C 60 minut

42 °C 30 minut

70 °C 5 minut

4 °C ∞

Vzorky cDNA lze uchovávat v lednici přibližně 1 týden. Abychom předešli jejich degradaci, část vzorků jsme odebrali a zamrazili na -20 °C.

2.2.4.5 Amplifikace cDNA

Při amplifikaci cDNA dochází ke zmnožení specifického úseku cDNA pomocí primerů pro daný gen.

Do plastové zkumavky s víčkem umístěné na ledu jsme napipetovali 1,0 µl vzorku cDNA, 4,0 µl DEPC vody a 20,0 µl PCR-mixu. Pro amplifikaci jsme připravovali také pozitivní a negativní kontrolu. Pozitivní kontrola byla dodána komerčně nebo jsme ji připravili tisícinásobným zředěním ze vzorku pozitivního při dané amplifikaci. V negativní kontrole byla nahrazena cDNA 1,0 µl DEPC vody.

PCR-mix:

13,0 µl DEPC vody

2,5 µl 10x PCR Rxn Bufferu (-MgCl₂)

1,5 µl MgCl₂, 50mM

1,0 µl ac. BSA, 1 mg / ml

0,5 µl dNTP, 10mM

0,5 µl primeru Sense, 10µM

0,5 µl primeru Antisense, 10µM

0,5 µl Taq polymerase, 5 U / µl

Vzorky jsme promíchali a inkubovali v PCR cykleru:

94 °C 5 minut

94 °C 30 sekund

60 °C nebo 55 °C	60 sekund
72 °C	45 sekund
72 °C	5 minut
4 °C	∞

Kroky 2-4 jsme opakovali podle použitého primeru 24-35krát.

Standardizace na β -actin

Vzorky cDNA jsme nejprve amplifikovali s použitím primerů pro β -actin. Tento gen je aktivovaný u všech buněk a slouží ke standardizaci cDNA. Produktem jsou stejně intenzivní proužky na gelu detekované pod UV lampou. Pokud proužky měly různou intenzitu, upravili jsme množství cDNA použité pro amplifikaci na 1,5 μ l nebo 2,0 μ l.

Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

Ke standardizované cDNA jsme přidávali primery pro TNF- α , IP-10, MyD88, Tbk-1, IRF-3, IFN- β a TLR4. Při amplifikaci jsme měnili počet cyklů, popřípadě teplotu kroku 3 (při tomto kroku dochází k nasednutí primerů na templátovou cDNA) tak, aby výsledné produkty byly co nejvíce rozlišené. Intenzitu proužků na gelu jsme porovnávali se standardními produkty amplifikace s primery pro β -actin.

2.2.4.6 Elektroforéza

Připravili jsme si 5x TBE pufr:

54 g TRIS

27,5 g kyseliny borité

20 ml 0,5M EDTA

do 1000 ml deionizované vody

úprava pH na hodnotu 8,0 kyselinou chlorovodíkovou

Desetinásobným naředěním 5x TBE pufru jsme získali 0,5x TBE pufr.

Pro elektroforézu jsme používali 1,5% agarózové gely. V mikrovlnné troubě jsme zahřátím rozpustili 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru. Roztok jsme nechali vychladnout na přibližně 65 °C. Poté jsme ho nalili do vaničky na gely s hřebínkem. Odstranili jsme vzniklé vzduchové bubliny a nechali přibližně 30 minut ztuhnout. Ztuhlý gel jsme přemístili do elektroforetické vany naplněné 0,5x TBE puforem. Do jednotlivých jamek jsme opatrně napipetovali 10 µl vzorku smíšeného s 1 µl barvičky Trackit Cyan/Orange Loading Buffer, která vzorek vizuálně ohraničila a tak umožnila kontrolu polohy vzorku. Pro kontrolu velikosti vzorku jsme do první jamky gelu umísťovali vždy 4 µl Gene Ruler 1 kB DNA Ladderu nebo 0,5 µl 1 kB Plus DNA Ladderu, který se v průběhu elektroforézy rozdělil po celé délce dráhy.

Vzorky na gel jsme nanášeli ve standardním pořadí:

DNA Ladder - negativní kontrola - pozitivní kontrola - vzorky pro 6hodinový interval – vzorky pro 24hodinový interval.

Elektroforézu jsme prováděli při napětí 100 V po dobu 45 minut. Poté jsme gel vyjmuli, 5 minut barvili v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 µg / ml (ethidium bromid se začlení do struktury DNA a umožní její detekci pod UV lampou) a 15 minut odbarvovali v deionizované vodě (pro odstranění nespecifického barvení). Někdy jsme přidávali 2 µl ethidium bromidu do rozpuštěné agarózy ochlazené na přibližně 65 °C před vylitím do formy, v tomto případě jsme již gel po elektroforéze nemuseli barvit. Gel jsme hodnotili pod UV lampou.

3 Výsledky

3.1 Provedení infekce a izolace RNA č.1

Buněčné linie A20 a J774 jsme infikovali *F. tularensis* LVS po dobu 3, 6 a 24 hodin. Izolaci RNA jsme prováděli metodou RNeasy Mini Column. K syntéze cDNA jsme použili 7 µl směsi RNA a DEPC vody a 1 µl Random primerů. Množství RNA v µl je uvedeno v posledním sloupci tabulky 3:

Tab. 3 Hodnoty absorbance RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA.

Označení vzorku	O.D. ₂₆₀	O.D. _{260/280}	Koncentrace RNA (µg / µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
A20 3h K	0,1990	1,943	0,398	5,03
A20 3h	0,1910	1,950	1,328	6,10
A20 6h	0,2695	1,879	0,539	3,71
A20 24h	0,2485	1,882	0,497	4,02
J774 3h K	0,3341	1,995	0,668	2,99
J774 3h	0,3243	1,898	0,649	3,08
J774 6h	0,3512	1,913	0,702	2,85
J774 24h	0,1595	1,835	0,319	6,27

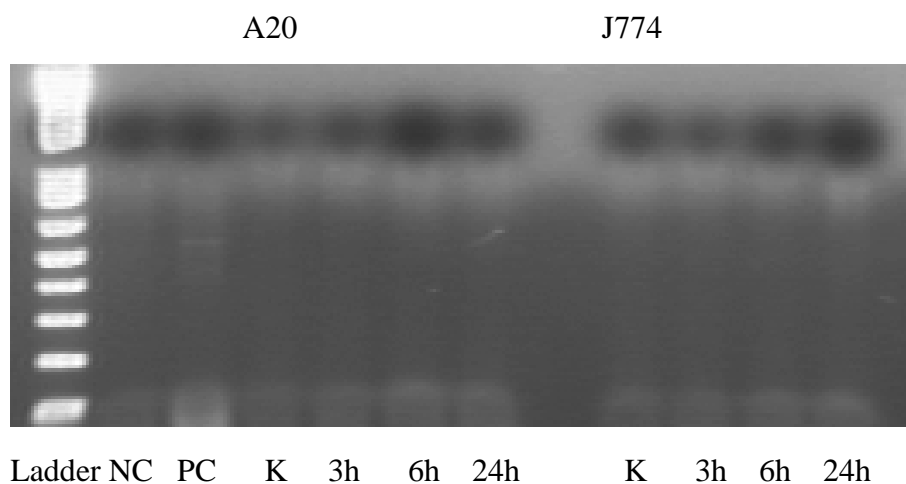
K – kontrolní neinfikované buňky

3h, 6h, 24h – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 3, 6 a 24 hodin

Ke standardizaci na β-actin (Obr. 5-7) jsme použili 2 µl cDNA, 3 µl DEPC vody a 20 µl PCR mixu, který obsahoval 0,1 µl Taq polymerázy. Amplifikovali jsme po dobu 29 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C. Ethidium bromid v množství 2 µl jsme přidali přímo do agarózového gelu. Jako standard jsme použili 1,5 µl 1 kB Plus DNA Ladderu. Negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a vzorky jsme nanášeli v množství 10 µl na jamku.

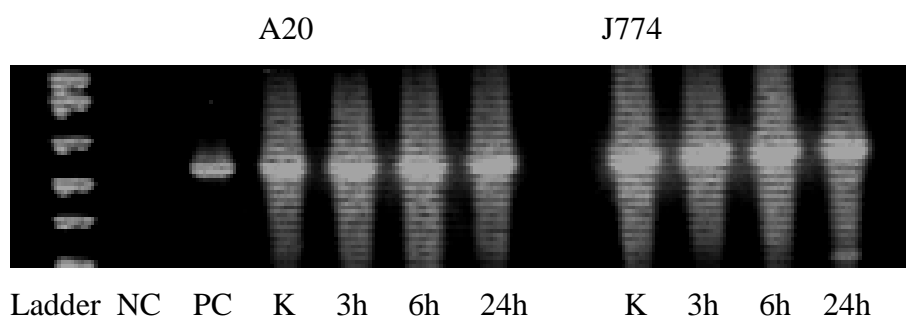
Označení gelů po provedené izolaci RNA č.1. : Ladder – 1 kB Plus DNA Ladder nebo Gene Ruler 1 kB DNA Ladder, NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola, K – kontrolní neinfikované buňky, 3h, 6h, 24h – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 3, 6 a 24 hodin.

Obr. 5 Detekce β -actinu č. 1



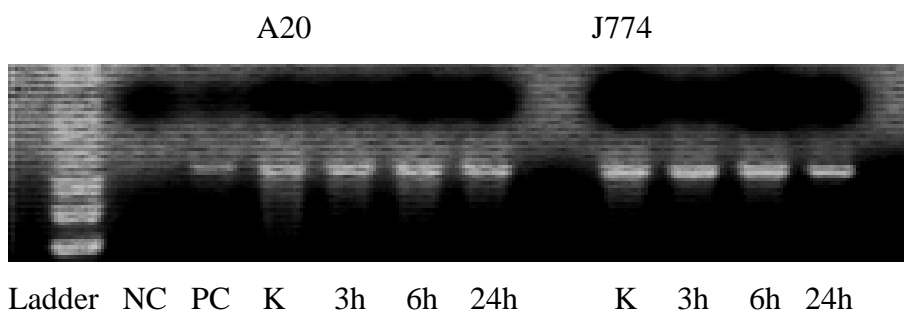
Kvůli negativnímu výsledku jsme amplifikaci zopakovali (Obr. 6). Množství Taq polymerázy jsme změnili na 0,5 μ l na vzorek. Na gel jsme nanášeli negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a vzorky po 10 μ l.

Obr. 6 Detekce β -actinu č. 2



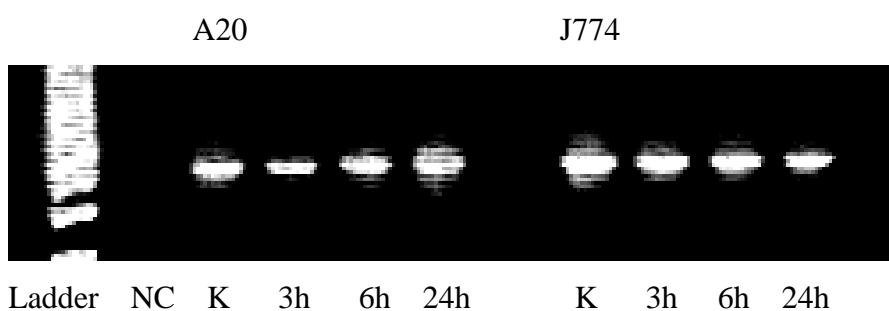
Amplifikaci jsme znovu zopakovali (Obr. 7). Použili jsme 1 μ l cDNA, 4 μ l DEPC vody a 20 μ l PCR mixu. Množství Taq polymerázy jsme upravili na 0,2 μ l. Amplifikovali jsme po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C. Na gel jsme nanášeli negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a vzorky po 5 μ l.

Obr. 7 Detekce β -actinu č. 3



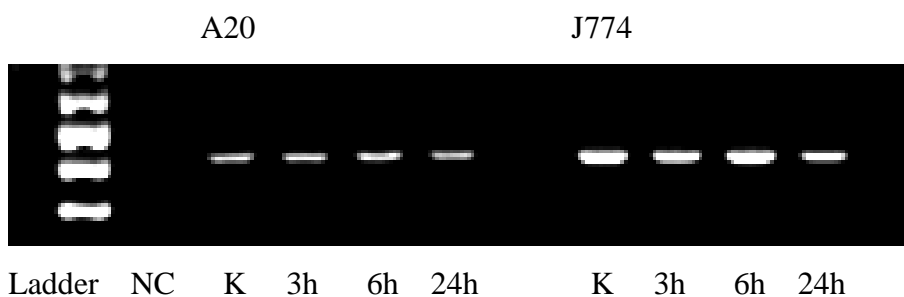
Gen pro TLR4 jsme amplifikovali nejprve po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 8). K amplifikaci jsme použili 1 μ l cDNA, na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku. Intenzita jednotlivých vzorků se příliš nelišila, takže jsme nemohli porovnávat míru exprese mezi časovými intervaly infikovaných buněk a kontrolními buňkami. Proto jsme amplifikaci opakovali a postupně snižovali počet cyklů (30, 28, 26 a 24 cyklů) tak, aby byly zřejmé rozdíly v intenzitě vzorků.

Obr. 8 Detekce TLR4 č. 1



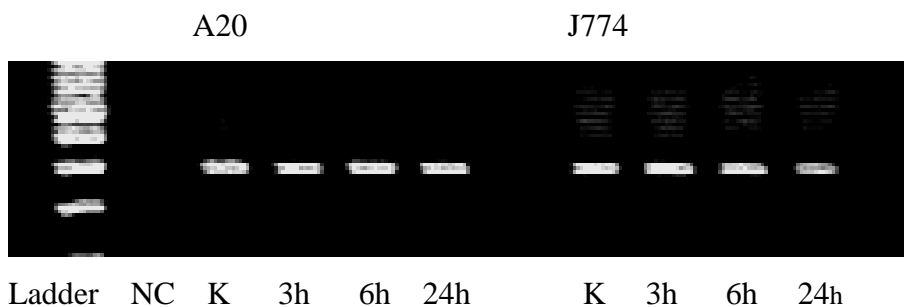
Optimálními podmínkami amplifikace u genu pro TLR4 bylo 24 cyklů a teplota „annealingu“ 60 °C (Obr. 9). U buněk A20 byla exprese srovnatelná s kontrolními buňkami po 3 a 6 hodinách infekce, po 24 hodinách infekce se exprese snížila. U buněk J774 se exprese genu zvyšovala k 6hodinovému intervalu, kdy byla srovnatelná s kontrolními buňkami, po 24 hodinách byla snižená.

Obr. 9 Detekce TLR4 č. 2



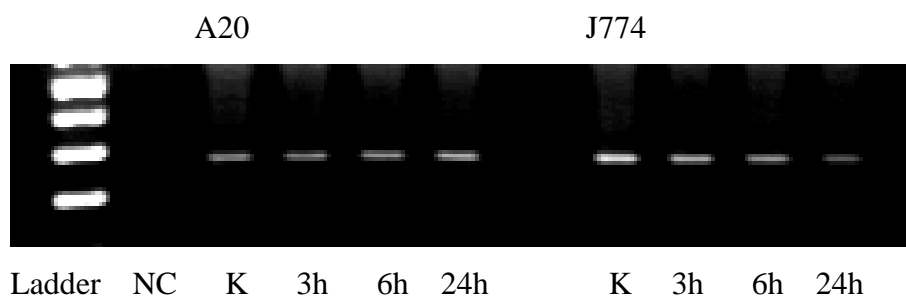
Gen pro Tbk-1 jsme amplifikovali po dobu 32 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 10). K amplifikaci jsme použili 1 μ l cDNA, na gel jsme nanášeli 5 μ l vzorku. Amplifikaci jsme zopakovali při 28, 26 a 24 cyklech, aby došlo k odlišení míry exprese jednotlivých vzorků.

Obr. 10 Detekce Tbk-1 č. 1



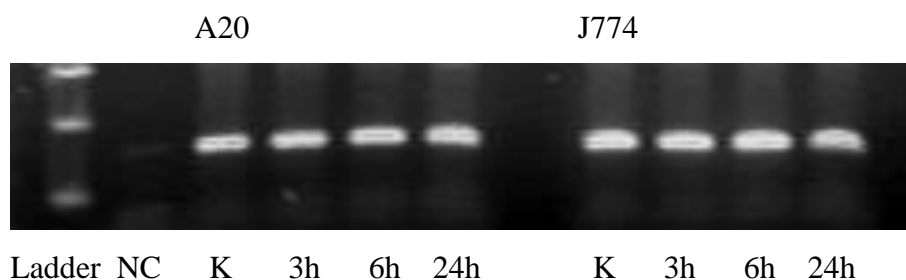
Optimální amplifikace pro gen pro Tbk-1 byla po dobu 24 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 11). Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku. U buněk A20 byla exprese genu pro Tbk-1 srovnatelná s kontrolními buňkami po 3 a 6 hodinách infekce, po 24 hodinách infekce byla mírně zvýšená. U buněk J774 byla exprese ve všech časových intervalech nižší v porovnání s kontrolními buňkami, postupně se snižovala ke 24hodinovému intervalu.

Obr. 11 Detekce Tbk-1 č. 2



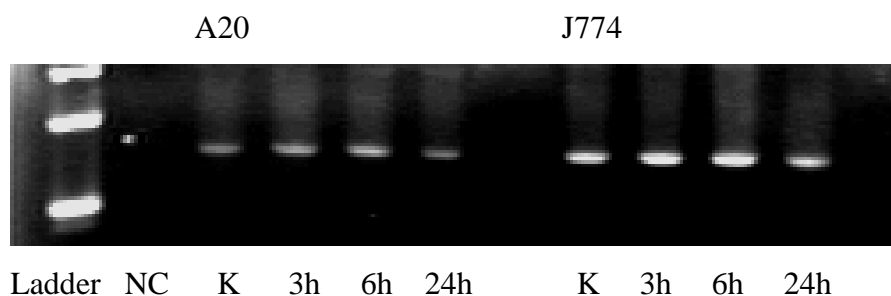
Gen pro MyD88 jsme amplifikovali po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 12). K amplifikaci jsme použili 1 µl cDNA, na gel jsme nanášeli 5 µl vzorku. Kvůli lepšímu rozlišení intenzity jednotlivých vzorků jsme amplifikaci zopakovali při 30, 28 a 26 cyklech.

Obr. 12 Detekce MyD88 č. 1



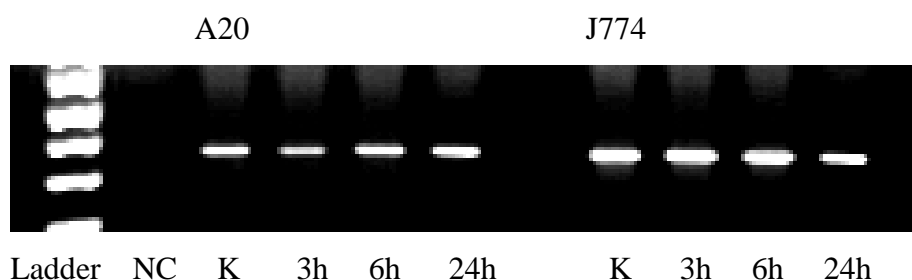
Optimální amplifikace u genu pro MyD88 byla při 26 cyklech a teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 13). Na gel jsme nanášeli 10 µl vzorku. U buněk A20 byla exprese genu pro MyD88 oproti kontrolním buňkám zvýšená po 3 a 6 hodinách infekce, snižená po 24 hodinách infekce. U buněk J774 byla exprese zvýšená po 3 a 6 hodinách, po 24 hodinách byla naopak snižená ve srovnání s kontrolními buňkami.

Obr. 13 Detekce MyD88 č. 2



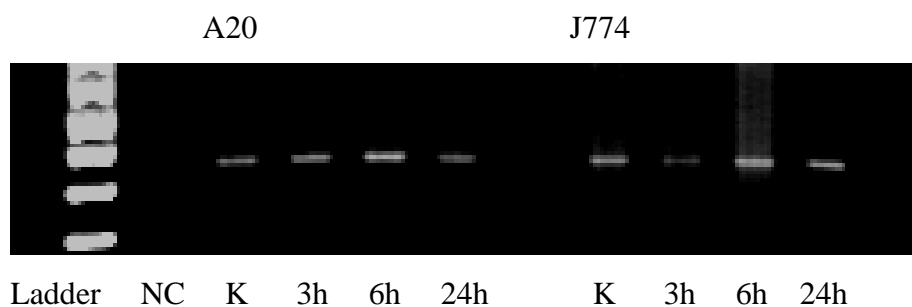
Gen pro IP-10 jsme amplifikovali po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 14). Na amplifikaci jsme použili 1 µl cDNA, na gel jsme nanášeli 10 µl vzorku. U buněk A20 se exprese genu pro IP-10 postupně zvyšovala. Po 3 hodinách infekce byla exprese nižší v porovnání s kontrolními buňkami, po 6 hodinách byla srovnatelná s kontrolními buňkami, po 24 hodinách již byla vyšší. U buněk J774 byla exprese genu srovnatelná s kontrolními buňkami ve 3 a 6hodinovém intervalu a snížená ve 24hodinovém intervalu.

Obr. 14 Detekce IP-10



Gen pro IRF-3 jsme amplifikovali po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 15). K amplifikaci jsme použili 1 µl cDNA, na gel jsme nanášeli 10 µl vzorku. Expresse tohoto genu byla u obou typů buněk nízká. U buněk A20 byla exprese oproti kontrolním buňkám zvýšená ve 3 a 6hodinovém intervalu, ve 24hodinovém intervalu byla srovnatelná s kontrolními buňkami. U buněk J774 byla exprese snížená ve srovnání s kontrolními buňkami ve 3hodinovém intervalu, zvýšená v 6hodinovém intervalu a srovnatelná ve 24hodinovém intervalu.

Obr. 15 Detekce IRF-3 č. 1



3.2 Provedení infekce a izolace RNA č. 2

Buněčné linie A20 a J774 jsme infikovali *F. tularensis* LVS nebo stimulovali *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS po dobu 6 a 24 hodin. Izolaci RNA jsme prováděli pomocí TriZolu. K syntéze cDNA jsme použili 7,5 µl směsi RNA a DEPC vody a 0,5 µl Random primerů. Množství RNA v µl je uvedeno v posledním sloupci tabulky 4.

Tab. 4 Hodnoty absorbance RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	O.D. ₂₆₀	O.D. _{260/280}	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
A20 6h K	0,3001	2,198	1,2004	1,67
A20 6h LVS	0,2218	2,191	0,8872	2,25
A20 6h <i>E.coli</i> LPS	0,2669	2,157	1,0676	1,87
A20 6h LVS LPS	0,2498	2,076	0,9992	2,00
A20 24h K	0,3807	1,636	1,5228	1,31
A20 24h LVS	0,1449	2,106	0,5796	3,45
A20 24h <i>E.coli</i> LPS	0,2572	1,759	1,0288	1,94
A20 24h LVS LPS	0,3034	1,899	1,2136	1,65
J774 6h K	0,4584	1,835	1,8336	1,09
J774 6h LVS	0,5100	1,951	2,04	0,98
J774 6h <i>E.coli</i> LPS	0,3667	1,982	1,4668	1,36
J774 6h LVS LPS	0,5635	1,964	2,254	0,89
J774 24h K	0,5307	1,877	2,1228	0,94
J774 24h LVS	0,3758	1,715	1,5032	1,33
J774 24h <i>E.coli</i> LPS	0,6574	1,796	2,6296	0,76
J774 24h LVS LPS	0,7150	1,817	2,860	0,70

K – kontrolní neinfikované buňky

LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS

E. coli LPS – buňky stimulované *E. coli* LPS

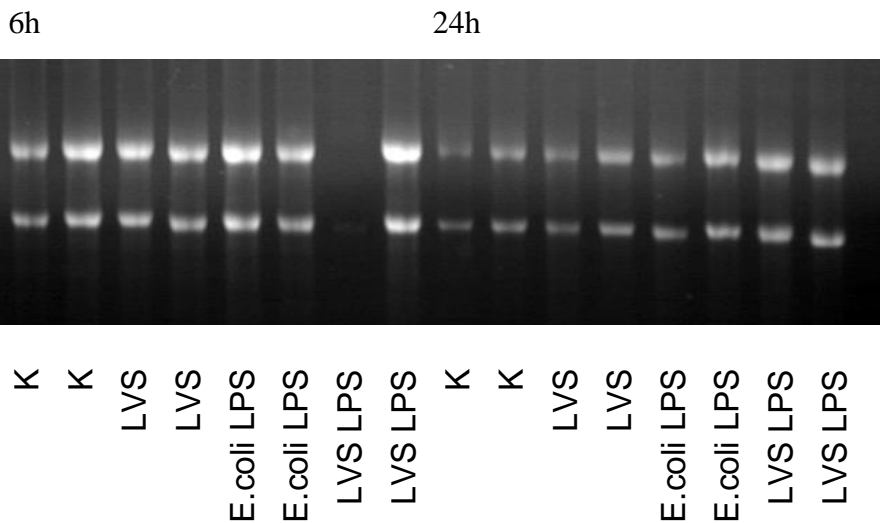
LVS LPS – buňky stimulované *F. tularensis* LPS

Kvalitu RNA jsme hodnotili pomocí agarózového gelu s obsahem 10x FA gel bufferu (obr. 16 A., B.).

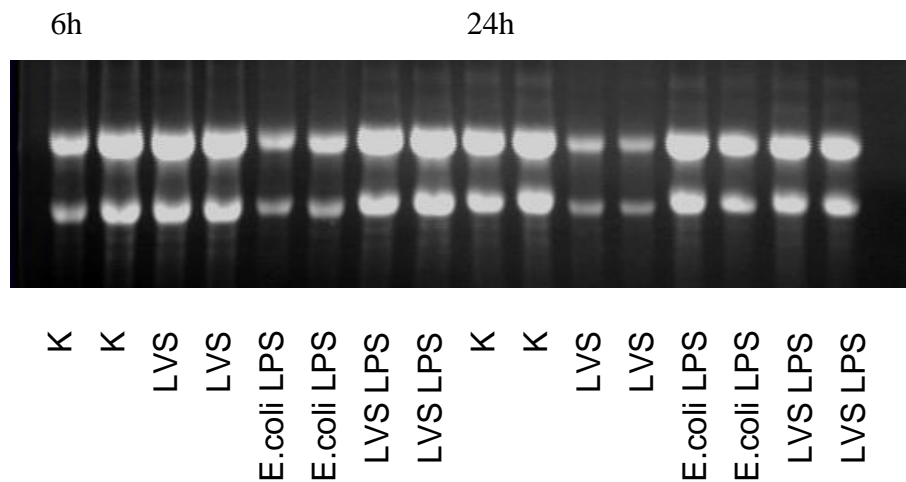
Označení gelů po provedené izolaci RNA č. 2: K – kontrolní neinfikované buňky, LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS, *E. coli* LPS – buňky stimulované *E. coli* LPS, LVS LPS – buňky stimulované *F. tularensis* LPS.

Obr. 16 Kvalita RNA

A. Buněčná linie A20



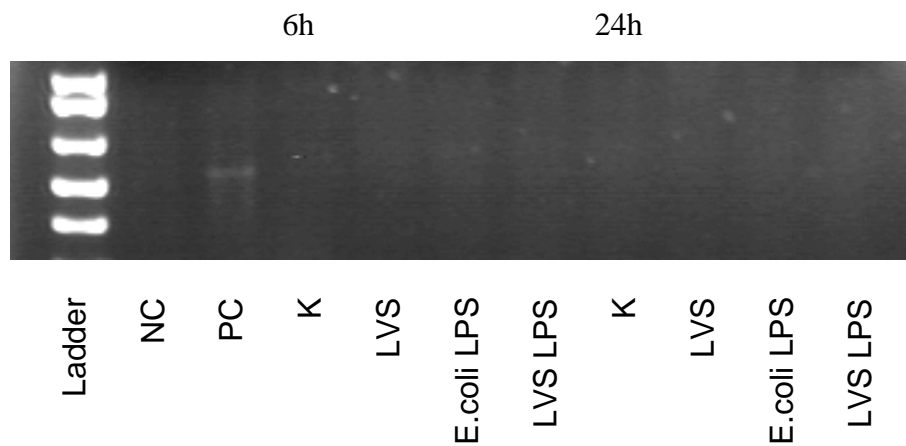
B. Buněčná linie J774



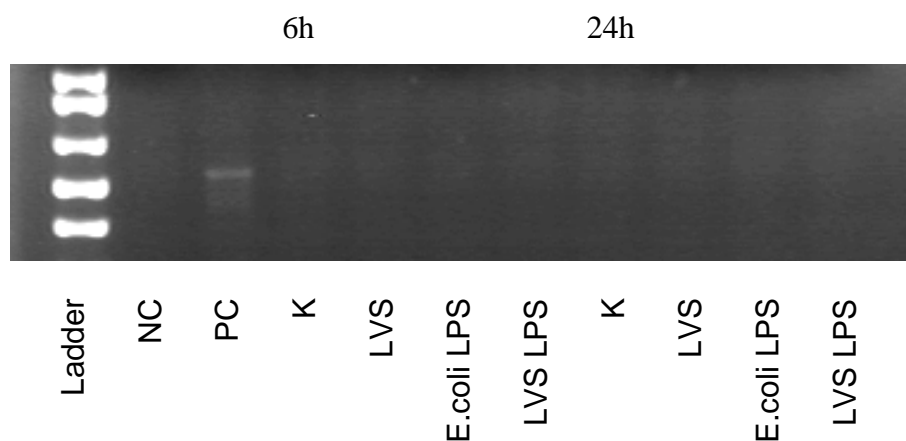
Ke standardizaci cDNA na β -actin jsme použili 1 μ l cDNA, 4 μ l DEPC vody a 20 μ l PCR mixu (s obsahem 0,2 μ l Taq polymerázy). Amplifikaci jsme prováděli po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 17 A., B.). Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku.

Obr. 17 Detekce β -actinu č. 1

A. Buněčná linie A20



B. Buněčná linie J774

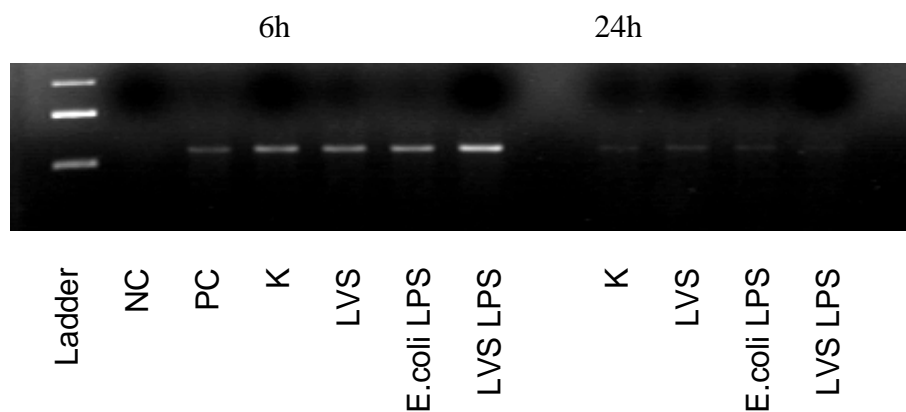


Kvůli negativnímu výsledku jsme provedli amplifikaci za použití pouze pozitivní kontroly, různých primerů pro β -actin, různých šarží Taq polymeráz a nových chemikálií. Vytvářeli jsme kombinace z primerů pro β -actin a Taq polymeráz. Důvodem negativního výsledku mohla být špatná kvalita použitých chemikálií (kontaminace), snížená aktivita enzymu nebo degradace primerů způsobená častým rozmrazováním a zamrazováním. Pro zopakování amplifikace se vzorky jsme vybrali kombinaci Taq polymerázy a primerů pro β -actin s největší intenzitou při detekci gelu pod UV lampou.

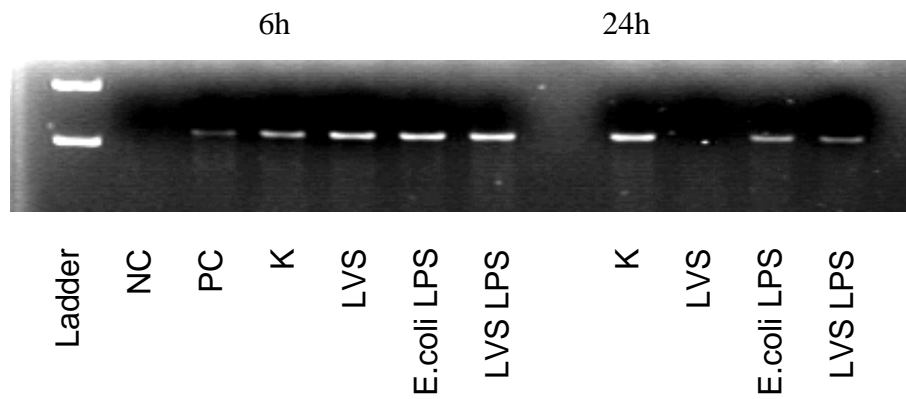
K amplifikaci vzorků (Obr. 18 A., B.) jsme použili 1 μ l cDNA, 4 μ l DEPC vody a 20 μ l PCR mixu. Množství Taq polymerázy jsme zvýšili na 0,5 μ l. Amplifikovali jsme po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C. Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku.

Obr. 18 Detekce β -actinu č. 2

A. Buněčná linie A20



B. Buněčná linie J774



Výsledky naznačují, že jsme zřejmě pro amplifikaci použili u některých vzorků méně cDNA. Proto jsme amplifikaci zopakovali (Obr. 19 A., B.) a množství cDNA upravili (Tab. 5). Amplifikovali jsme po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C. Na gel jsme nanášeli 10 µl vzorku.

Tab. 5 Množství cDNA, DEPC vody a PCR mixu pro amplifikaci β -actinu č. 3.

Označení vzorku	Množství cDNA (μ l)	Množství DEPC vody (μ l)	Množství PCR mixu (μ l)
A20 6h K	1,5	3,5	20,0
A20 6h LVS	1,5	3,5	20,0
A20 6h <i>E.coli</i> LPS	1,5	3,5	20,0
A20 6h LVS LPS	1,0	4,0	20,0
A20 24h K	2,0	3,0	20,0
A20 24h LVS	2,0	3,0	20,0
A20 24h <i>E.coli</i> LPS	2,0	3,0	20,0
A20 24h LVS LPS	2,0	3,0	20,0
J774 6h K	1,5	3,5	20,0
J774 6h LVS	1,0	4,0	20,0
J774 6h <i>E.coli</i> LPS	1,0	4,0	20,0
J774 6h LVS LPS	1,0	4,0	20,0
J774 24h K	1,0	4,0	20,0
J774 24h LVS	1,5	3,5	20,0
J774 24h <i>E.coli</i> LPS	1,5	3,5	20,0
J774 24h LVS LPS	1,5	3,5	20,0

K – kontrolní neinfikované buňky

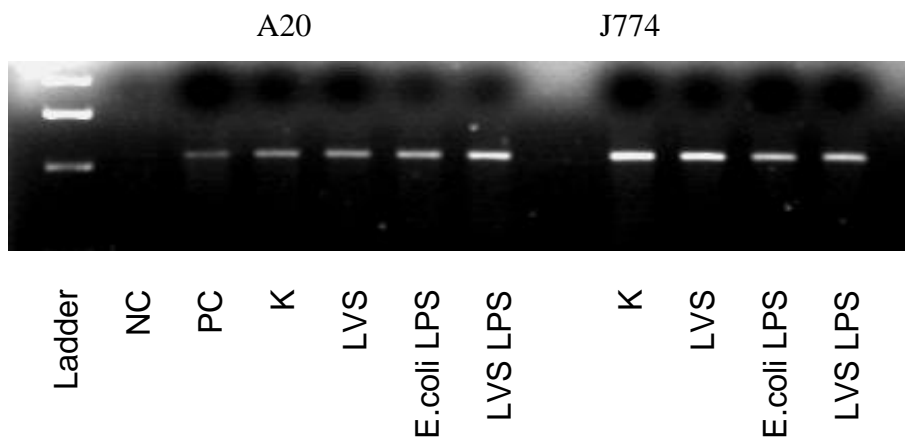
LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS

E.coli LPS – buňky stimulované *E. coli* LPS

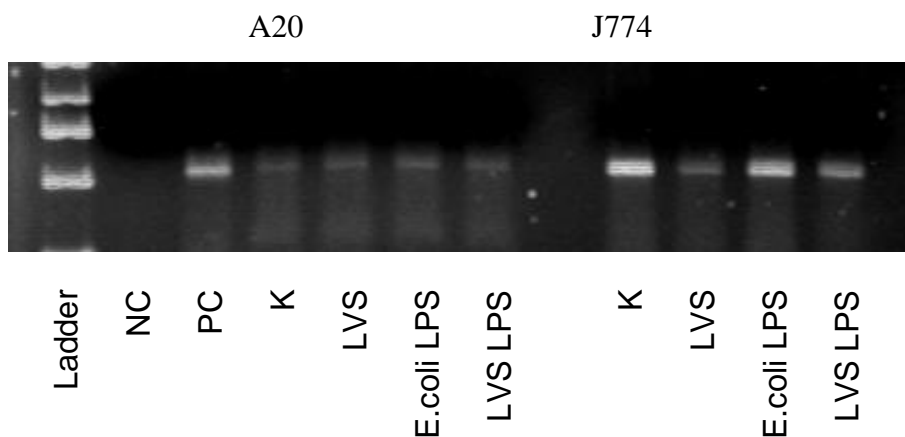
LVS LPS – buňky stimulované *F. tularensis* LPS

Obr. 19 Detekce β -actinu č. 3

A. 6hodinový interval



B. 24hodinový interval



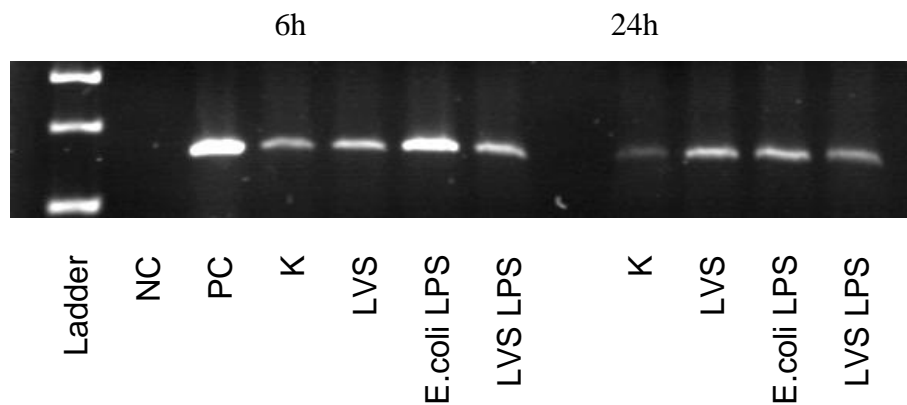
Amplifikaci ostatních genů jsme prováděli s množstvím cDNA uvedeném v Tab. 5.

Gen pro IP- 10 jsme amplifikovali po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 20 A., B., C.). Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku. U buněčné linie A20 byla exprese genu pro IP-10 zvýšená u buněk stimulovaných *E. coli* LPS v 6hodinovém intervalu, ve 24hodinovém intervalu byla exprese snižená, porovnatelná s expresí u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS. Expresse u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS a u buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS se během jednotlivých časových intervalů příliš neměnila. U buněčné linie J774 se jednotlivé vzorky příliš nelišily v intenzitě, proto jsme amplifikaci zopakovali a snížili počet cyklů na 30 (Obr. 21). Expresse tohoto genu byla zvýšená u buněk stimulovaných *E. coli* LPS v obou časových

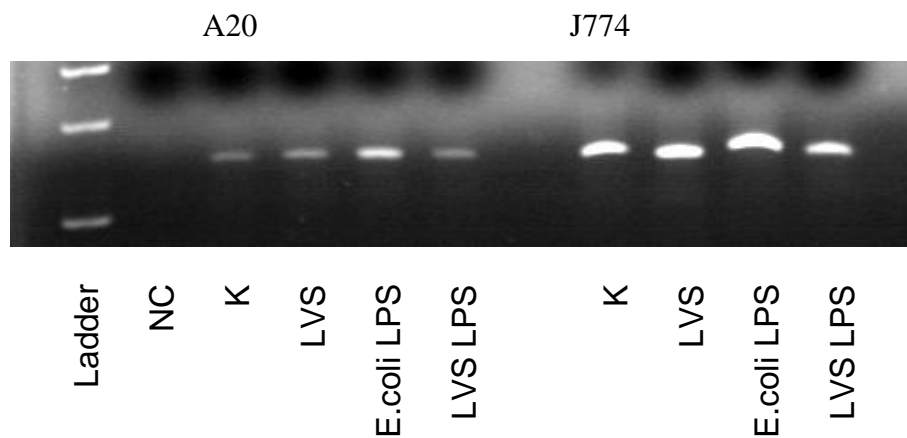
intervalech v porovnání s kontrolními buňkami. Exprese u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS byla v 6hodinovém intervalu srovnatelná s kontrolními buňkami, ve 24hodinovém intervalu došlo k výraznému snížení exprese. Exprese u buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS se během jednotlivých časových intervalů příliš neměnila.

Obr. 20 Detekce IP-10 č. 1

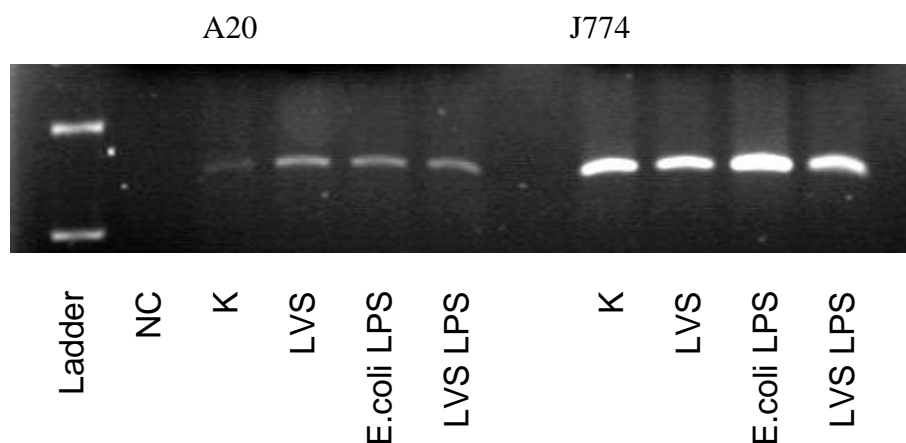
A. Buněčná linie A20



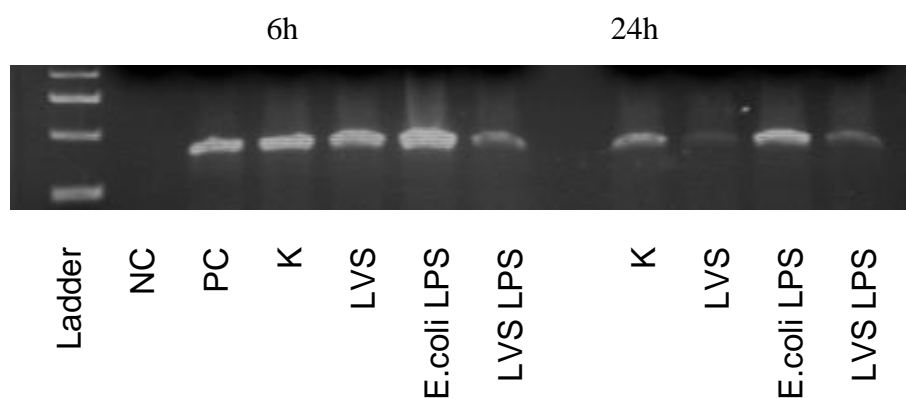
B. 6hodinový interval



C. 24hodinový interval



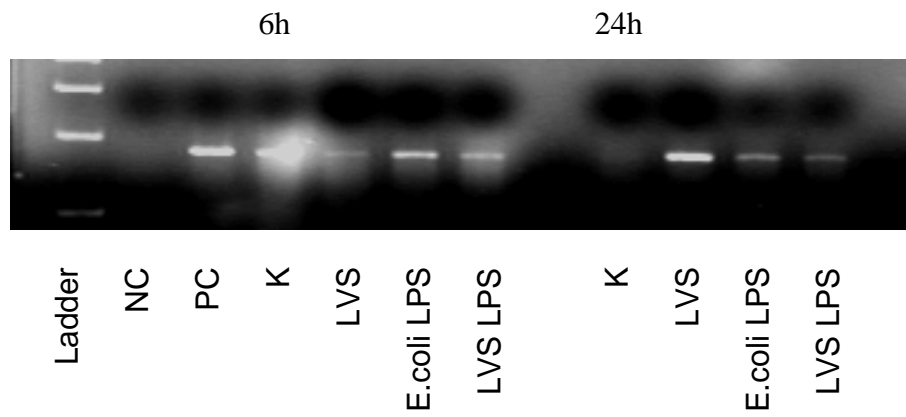
Obr. 21 Detekce IP-10 č. 2 – buněčná linie J774



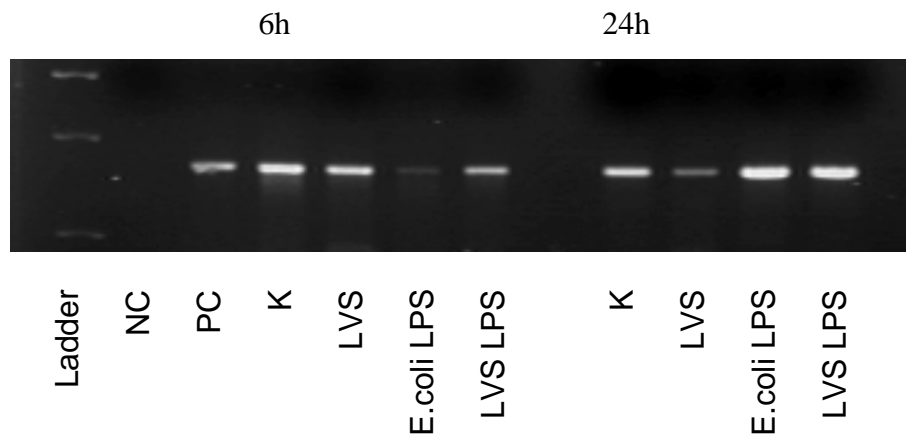
Optimálními podmínkami pro amplifikaci genu pro TNF- α bylo 33 cyklů a teplota „annealingu“ 60 °C (Obr. 22 A., B.). U buněčné linie A20 byla snižená exprese genu pro TNF- α v 6hodinovém intervalu u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS a u buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS v porovnání s kontrolními buňkami. Expresse u buněk stimulovaných *E. coli* LPS byla srovnatelná s kontrolními buňkami. Ve 24hodinovém intervalu došlo ke zvýšení exprese u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS. U buněčné linie J774 byla v 6hodinovém intervalu snižená exprese genu u buněk stimulovaných *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS oproti kontrolním buňkám. Expresse u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS byla srovnatelná s kontrolními buňkami. Ve 24hodinovém intervalu byla snižená exprese u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS v porovnání s kontrolními buňkami, zvýšená exprese byla u buněk stimulovaných *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS.

Obr. 22 Detekce TNF- α

A. Buněčná linie A20



B. Buněčná linie J774



3.3 Provedení infekce a izolace RNA č. 3

Buněčné linie A20, J774 a Ramos jsme infikovali *F. tularensis* LVS nebo stimulovali *E. coli* LPS a *F. tularensis* LPS po dobu 6 a 24 hodin. Izolaci RNA jsme prováděli pomocí TriZolu. K syntéze cDNA jsme použili 5 µl směsi RNA a DEPC vody a 3 µl Oligo primerů. Množství RNA v µl je uvedeno v posledním sloupci tabulky 6:

Tab. 6 Hodnoty absorbance RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA č. 3.

Označení vzorku	O.D. ₂₆₀	O.D. _{260/280}	Koncentrace RNA (µg / µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
A20 6h K	0,3576	2,068	1,4	1,4
A20 6h LVS	0,8748	1,973	3,5	0,6
A20 6h <i>E.coli</i> LPS	0,3528	2,025	1,4	1,4
A20 6h LVS LPS	0,8838	1,958	3,5	0,6
A20 24h K	0,1247	1,906	0,5	4,0
A20 24h LVS	0,2284	1,972	0,9	2,2
A20 24h <i>E.coli</i> LPS	0,1946	1,967	0,7	2,9
A20 24h LVS LPS	0,1230	1,889	0,4	5,0
J774 6h K	0,8838	2,021	3,5	0,6
J774 6h LVS	0,7925	2,328	3,2	0,6
J774 6h <i>E.coli</i> LPS	0,5336	1,942	2,1	1,0
J774 6h LVS LPS	0,6409	2,020	2,5	0,8
J774 24h K	0,5954	1,947	2,4	0,8
J774 24h LVS	0,3240	1,779	1,3	1,5
J774 24h <i>E.coli</i> LPS	0,6633	1,945	2,6	0,8
J774 24h LVS LPS	0,7761	1,959	3,1	0,6

K – kontrolní neinfikované buňky

LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS

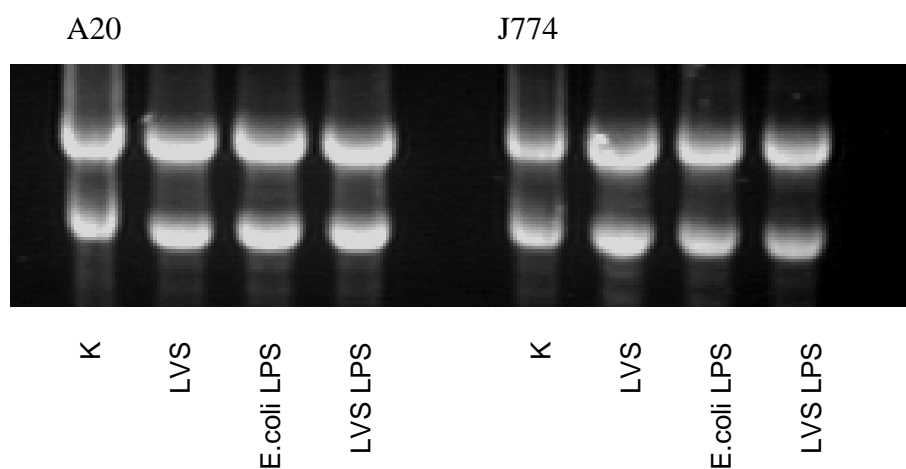
E. coli LPS – buňky stimulované lipopolysacharidem *E. coli*

LVS LPS – buňky stimulované lipopolysacharidem *F. tularensis*

Kvalitu RNA jsme hodnotili pomocí agarózového gelu s obsahem 10x FA gel bufferu (obr. 23). Hodnocení kvality RNA pro 24hodinový interval jsme neprovedli ihned. Později již byla RNA degradována, proto obrázek chybí.

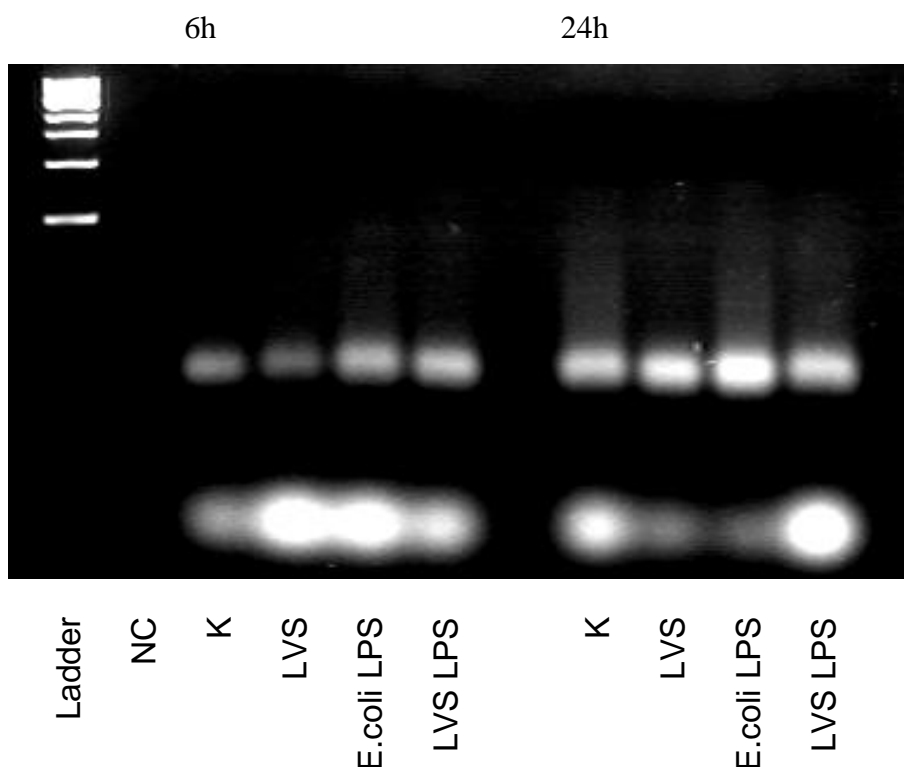
Označení gelů po provedené izolaci RNA č. 3: K – kontrolní neinfikované buňky, LVS – buňky infikované *F. tularensis* LVS, *E. coli* LPS – buňky stimulované lipopolysacharidem *E. coli*, LVS LPS – buňky stimulované lipopolysacharidem *F. tularensis*.

Obr. 23 Kvalita RNA – 6hodinový interval



Ke standardizaci cDNA na β_2 -mikroglobulin jsme použili 2 μ l cDNA, 3 μ l DEPC vody a 20 μ l PCR mixu (použili jsme po 1,0 μ l primerů pro β_2 -mikroglobulin a 0,5 μ l Taq polymerázy). Amplifikaci jsme prováděli po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 24). Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku. Vzhledem ke špatné kvalitě amplifikovaných genů a problémům se standardizací během předchozích pokusů došlo zřejmě k degradaci primerů vlivem časté manipulace a také stářím primerů. Pro nedostatek času jsme již nemohli provádět další pokusy.

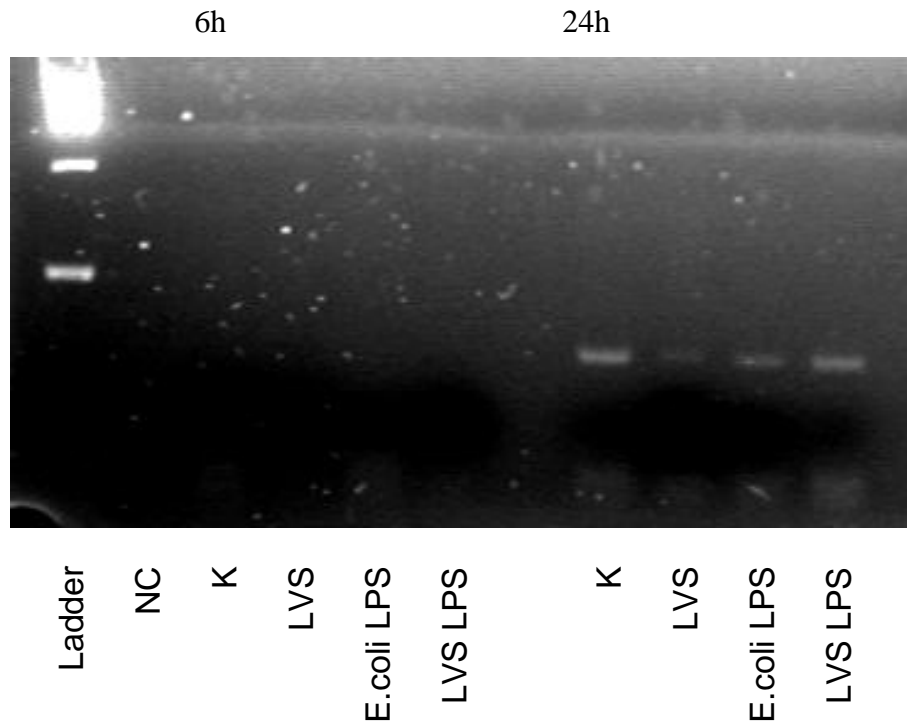
Obr. 24 Detekce β_2 -mikroglobulinu – buněčná linie J774



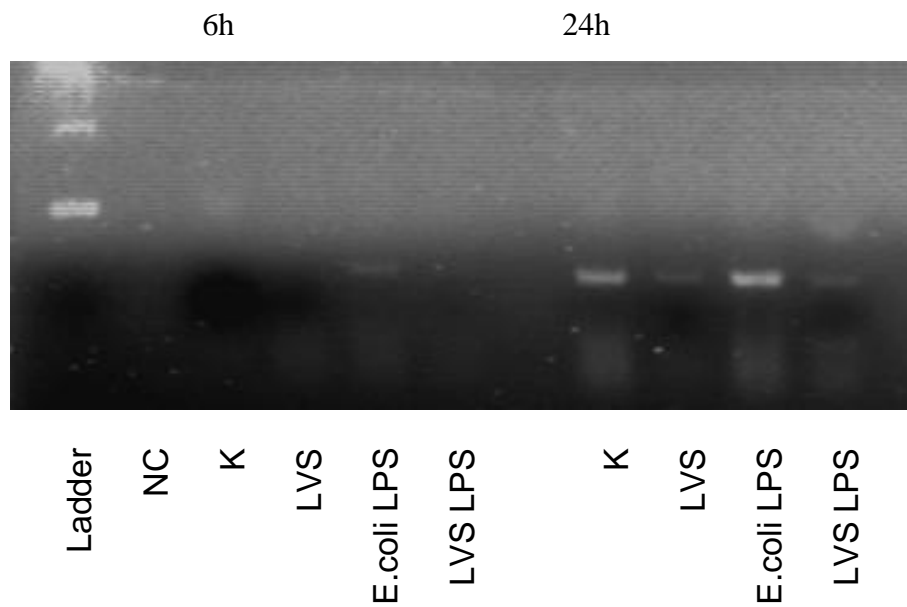
Amplifikaci genu pro IFN- β jsme prováděli po dobu 33 cyklů při teplotě „annealingu“ 55 °C (Obr. 25 A., B.). K amplifikaci jsme použili 2 μ l cDNA, 3 μ l DEPC vody a 20 μ l PCR mixu (s použitím 1,0 μ l primerů pro IFN- β a 0,5 μ l Taq polymerázy). Na gel jsme nanášeli 10 μ l vzorku. U buněčné linie A20 nelze v 6hodinovém intervalu gen pro IFN- β detekovat. Ve 24hodinovém intervalu byla exprese potlačena u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS a u buněk stimulovaných *E. coli* LPS v porovnání s kontrolními buňkami. U buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS byla exprese srovnatelná s kontrolními buňkami. Také u buněčné linie J774 není detekovatelná exprese genu pro IFN- β v 6hodinovém intervalu. Ve 24hodinovém intervalu zůstala exprese potlačena u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS a u buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS. Expresse u buněk stimulovaných *E. coli* LPS byla oproti kontrolním buňkám zvýšená.

Obr. 25 Detekce IFN- β

A. Buněčná linie A20



B. Buněčná linie J774



Amplifikaci jsme zopakovali s použitím 35 cyklů, ale zřejmě došlo během skladování cDNA k její degradaci, pokus se nezdařil. Z časových důvodů jsme již v práci nepokračovali.

4 Diskuse

Makrofágy jsou primárním cílem invaze intracelulárních a fakultativně intracelulárních mikroorganismů. Neomezeným intracelulárním růstem patogenů by mohlo dojít k zániku makrofágů a rozšíření infekce, proto spouští antimikrobiální obrannou reakci, která zahrnuje sekreci chemokinů a cytokinů. Tento efektorový mechanismus hostitelské buňky je spuštěn interakcí mezi ligandem a receptorem na povrchu makrofágů. Aktivace intracelulárních signálních cest vede k transkripčnímu faktoru NF- κ B a kinázám JNK, p38 a MAPK. Porušení některé signální cesty vede k omezení sekrece antibakteriálních efektorových molekul, např. TNF- α , IL-1 a IL-8 a oslabení rezistence vůči infekci. Např. makrofágy neschopné aktivovat NF- κ B podléhají rychlé apoptóze při infekci *E. coli* nebo stimulaci enterobakteriálním LPS. V několika studiích byla popsána schopnost intracelulárních patogenů ovlivnit NF- κ B a MAPK a předejít tak aktivaci antimikrobiálních efektorových mechanismů makrofágů.

F. tularensis infikuje fagocytující i nefagocytující buňky, ve kterých se následně rychle množí. Zatím nebyl vysvětlen mechanismus této schopnosti. Také nebyl nalezen žádný sekreční systém podobný některým patogenním intracelulárním bakteriím, např. *Shigella*, *Salmonella*, *Brucella*, *Legionella*, ani nebyla popsána produkce toxinů. Během intracelulárního růstu indukuje *F. tularensis* pouze malé množství stresových proteinů, což naznačuje, že je zřejmě dobře přizpůsobena na intracelulární podmínky (18).

Členové rodiny receptorů TLR se vyznačují Toll/IL-1 doménou společnou i pro receptory IL-1. Obsazení těchto receptorů příslušnými ligandy vede k zapojení některé z adaptorových molekul obsahujících TIR doménu (MyD88, Mal/TIRAP, TRIF/TICAM-1, TRAM/TICAM-2), k strukturální změně a následné aktivaci kináz a efektorových molekul signálních cest (17). Důležitou úlohu při signalizaci mají transkripční faktory NF- κ B (u MyD88-závislé cesty), který vede k produkci např. TNF- α nebo IL-1 a IRF-3 (u MyD88-nezávislé cesty), jehož translokace do jádra vede k aktivaci genů pro IFN- β a genů indukovaných IFN (31).

Podle Nomura a kol. (2000) je jedním z možných mechanismů, který brání aktivaci NF- κ B u buněk stimulovaných LPS „down-regulace“ receptorů TLR. Telepnev a kol. (2003) považují za více pravděpodobné, že inhibice „up-regulace“ TLR receptorů je sekundární jev blokády intracelulárních signálních cest. U buněk infikovaných

F. tularensis k tomuto jevu došlo až po inhibici NF- κ B a MAPK (18). Po infekci monocyto-makrofágové buněčné linie J774 *F. tularensis* LVS jsme nepozorovali výrazné změny v expresi genu pro TLR4 během jednotlivých časových intervalů (3, 6 a 24 hodin). V 6hodinovém intervalu byla exprese tohoto genu srovnatelná s kontrolními buňkami, ve 24hodinovém intervalu došlo k mírnému snížení exprese. Protože po 24 hodinách infekce je signální cesta vedoucí k produkci TNF- α přes transkripční faktor NF- κ B již zablokována, může být snížení exprese genu pro TLR4 druhotným jevem blokádou popsaným Telepnevem a kol. (2003).

Adaptorová molekula MyD88 se uplatňuje u signalizace přes všechny receptory TLR s výjimkou TLR3. Asociací intracelulární TIR domény TLR a TIR domény MyD88 dochází k aktivaci serin/threoninové kinázy IRAK, která je fosforylována a asociována s TRAF-6. Tato signální dráha vede k transkripčnímu faktoru NF- κ B nebo kináze MAPK a následné expresi genů prozánětlivých cytokinů, např. TNF- α (15, 17). U buněčné linie J774 infikované *F. tularensis* LVS jsme nepozorovali v expresi genu pro MyD88 během jednotlivých časových intervalů výrazné rozdíly. Podobně jako u genu pro TLR4 došlo ve 24hodinovém intervalu k mírnému snížení exprese. Mechanismus snížení exprese bude zřejmě stejný jako u receptoru TLR4.

TNF- α je základním cytokinem při imunitní odpovědi na bakteriální a některé houbové, virové a parazitární infekce, způsobuje nekrózu specifických tumorů a také se uplatňuje jako klíčový mediátor při imunitní odpovědi na lokální zánět. Jako protein akutní fáze aktivuje kaskádu cytokinů, zvyšuje vaskulární permeabilitu a zapojuje do reakce makrofágy a neutrofilů. Ve velkých množstvích může způsobit aktivaci šokové kaskády (32). Spolu s IFN- γ aktivuje makrofágy a umožňuje buňkám kontrolu růstu anebo usmrcení intracelulárních patogenů v důsledku tvorby reaktivních kyslíkových a reaktivních dusíkových intermediátů (33).

Schopnost *F. tularensis* inhibovat signální cesty přes TLR popsal Telepnev a kol. (2003). Při infekci monocyto-makrofágové linie J774 *F. tularensis* LVS došlo k blokádě intracelulárních signálních cest vedoucích k NF- κ B, p38 a c-Jun. Infikované buňky neprodukovaly TNF- α a IL-1 ani při stimulaci enterobakteriálním LPS nebo BLP (bakteriální lipopeptid). Cíl inhibice zatím nebyl lokalizován (18). V souladu s publikovanými výsledky (Telepnev a kol., 2003) jsme u buněk monocyto-makrofágové linie J774 infikovaných *F. tularensis* LVS pozorovali ve 24hodinovém intervalu potlačení exprese genu pro TNF- α , zatímco buňky stimulované *E. coli* LPS

v témže časovém intervalu vykazovaly expresi naopak zvýšenou oproti kontrolním buňkám. Oproti publikovaným výsledkům (Telepnev a kol., 2003) jsme detekovali u buněk stimulovaných *E. coli* LPS sníženou expresi genu v 6hodinovém intervalu a u buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS zvýšenou expresi genu ve 24hodinovém intervalu. Důvodem by mohlo být odlišné uspořádání pokusu.

Schopnost inhibice aktivace NF- κ B byla popsána u intracelulárních bakterií *Leishmania donovani*, *Yersinia enterocolica* a u vývojového stádia tachyzoit intracelulárního prvoka *Toxoplasma gondii*. Inaktivní NF- κ B se vyskytuje v cytoplazmě v komplexu s inhibičními proteiny I κ B- α a I κ B- β . Aktivací signální dráhy dochází k fosforylaci a degradaci inhibičních proteinů. Uvolněný NF- κ B je translokován do jádra, kde se váže na cílové sekvence a aktivuje transkripci genů pro cytokiny a chemokiny. *Yersinia enterocolica* a *Toxoplasma gondii* vyvinuly stejný mechanismus inhibice NF- κ B, který spočívá v zabránění fosforylace a degradace inhibičních proteinů I κ B- α a I κ B- β (38, 39). U intracelulární bakterie *Leishmania donovani* mechanismus inhibice NF- κ B zatím nebyl zcela objasněn, nejspíše souvisí se zvýšenou intracelulární hladinou ceramidu a potlačením ERK (extracellular signal-regulated kinase) (40). U *F. tularensis* byla popsána inhibice NF- κ B a tím i produkce např. TNF- α , což potvrdila i naše práce, cíl zásahu zatím ale nebyl lokalizován.

IRF-3 je členem rodiny transkripčních faktorů regulovaných IFN. U neinfikovaných buněk se nachází v cytoplazmě. Po infekci dochází k jeho aktivaci fosforylací na serinovém zbytku C-konce působením IRF-kináz Tbk-1 a IKK-i a transportu do jádra buňky, kde zprostředkovává indukci genů pro IFN- β a některé geny indukované IFN (16).

Signální cesta nezávislá na adaptorovém proteinu MyD88, vedoucí k transkripčnímu faktoru IRF-3 zatím nebyla zkoumána v takovém rozsahu jako signální cesta vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B. Vliv *F. tularensis* na tuto paralelní signální cestu aktivace nebyl dosud studován vůbec. Exprese genu pro Tbk-1 po infekci buněčné linie J774 *F. tularensis* LVS byla nízká oproti kontrolním buňkám, ve 24hodinovém intervalu infekce došlo ještě ke snížení exprese. U genu pro IRF-3 jsme detekovali zvýšení exprese v 6hodinovém intervalu, zatímco ve 24hodinovém intervalu došlo ke snížení exprese. Snížení exprese obou genů po 24 hodinách infekce zřejmě souvisí se zablokováním celé této signální cesty.

IP-10 je protein o velikosti 10 kDa z rodiny chemokinů CXC (C označuje pozici cysteinového zbytku). Jeho exprese je indukována vlivem mnoha zánětlivých mediátorů, např. IL-1, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , LPS. Mezi jeho funkce patří stimulace migrace monocytů, NK-buněk a T-buněk, zrání progenitorových buněk kostní dřeně, modulace exprese adhezivních molekul a inhibice angiogeneze (34). Při detekci exprese genu pro IP-10 u buněk J774 infikovaných *F. tularensis* LVS jsme zaznamenali výrazné snížení exprese tohoto genu ve 24hodinovém intervalu. U buněk stimulovaných *F. tularensis* LPS byla exprese celkově nízká v důsledku neobvyklé struktury lipopolysacharidu. Naopak *E. coli* LPS jako silný stimulant vyvolal expresi zvýšenou v obou časových intervalech oproti kontrolním buňkám.

IFN- β patří mezi cytokiny z rodiny interferonů typu I. Primárním intracelulárním signálem pro jeho produkci je virová dvouřetězcová RNA (35). Uplatňuje se při nespecifické antivirové imunitní odpovědi, kdy umožňuje inhibici buněčné proliferace, rozvoj apoptózy, aktivaci mikrobicidních funkcí makrofágů a NK-buněk a propojení nespecifické a specifické imunitní odpovědi. Některé studie popisují expresi genů pro interferony typu I indukovanou také bakteriálním LPS přes TLR4 (36). V souladu s tímto faktem jsme po stimulaci buněčné linie J774 *E. coli* LPS detekovali zvýšenou expresi genu pro IFN- β . U buněk infikovaných *F. tularensis* LVS došlo ve 24hodinovém intervalu infekce k potlačení exprese tohoto genu. Vzhledem k potlačení exprese genů jak pro IP-10, tak pro IFN- β a snížení exprese genů pro IRF-3 a Tbk-1 ve 24hodinovém intervalu je zřejmě *F. tularensis* schopná zabránit aktivaci signální cesty nezávislé na MyD88.

Některé intracelulární bakterie naopak cíleně aktivují signální cestu nezávislou na MyD88 a zvyšují produkci určitých cytokinů. Např. *Listeria monocytogenes* po fagocytóze makrofágy je schopna s pomocí specifických faktorů virulence uniknout do cytoplazmy hostitelské buňky. Zde aktivuje signální kaskády, charakteristické produkcí IFN- β . Zároveň dochází k potlačení akumulace fagocytů produkujících TNF- α v místě bakteriálního růstu a rozvoje infekce (37). Zvýšená sekrece interferonů typu I hraje důležitou roli během potlačení virové infekce. Při infekci *L. monocytogenes* však tyto cytokiny inhibují obranné reakce hostitelské buňky zatím ne zcela objasněným mechanismem a *L. monocytogenes* využívá buněčných podmínek vzniklých působením interferonů typu I ve svůj prospěch (36). Tento mechanismus je zřejmě opačný než u *F. tularensis*.

Z naší práce vyplývá, že u buněčné linie J774 infikované *F. tularensis* LVS dochází nejen k blokadě signální cesty vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B a produkci TNF- α , ale zřejmě také k blokadě paralelní signální cesty vedoucí k transkripčnímu faktoru IRF-3 a tím k zamezení exprese genů prozánětlivých cytokinů a chemokinů, jako jsou námi sledovaný IP-10 a IFN- β .

Úloha B-buněk během vytváření imunity byla tradičně přisuzována tvorbě protilátek. Při infekci intracelulárními patogeny mají ale protilátky pouze malý význam vzhledem k lokalizaci patogenu uvnitř buňky, která ho chrání před účinným navázáním protilátek (1). Přímá interakce intracelulární bakterie s B-buňkami byla poprvé popsána Menonem a kol. (2003). Zjistil, že *Listeria monocytogenes* je schopna interagovat s B-buňkami a způsobit jejich apoptózu (28). Nedávno se podařilo detekovat přímé interakce mezi lidskými B-buňkami Ramos a *F. tularensis* Kročové a kol. (29). Také v tomto případě byla výsledkem interakce apoptóza B-buněk.

Na povrchu B-buněk jsou exprimovány 2 receptory pro lipopolysacharid gram-negativních bakterií – TLR4 a RP105. Stimulací TLR4 je aktivována signální cesta vedoucí přes MyD88, IRAK a TRAF6 k transkripčnímu faktoru NF- κ B. Stimulací RP105 se aktivuje buď signální cesta přes proteiny Lyn, CD19 a Vav vedoucí k JNK nebo signální cesta přes PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) a Btk vedoucí k NF- κ B (27). Nepodařilo se nám najít žádné literární zdroje, ve kterých by byl popsán vliv *F. tularensis* na signální cesty u B-buněk.

Naším cílem v rámci práce s B-buňkami bylo mimo jiné zjistit, zda je u těchto buněk aktivována signální cesta vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B. U buněčné linie A20 infikované *F. tularensis* LVS jsme po 6 hodinách infekce detekovali zvýšenou expresi genu pro MyD88 oproti kontrolním buňkám, po 24 hodinách infekce jsme detekovali sníženou expresi genu pro TLR4 a genu pro MyD88. Exprese genu pro TNF- α byla v tomto časovém intervalu naopak zvýšená. Transkripční faktor NF- κ B tedy zřejmě po infekci aktivován je, ale je možné, že k aktivaci dochází jiným způsobem anebo v jiných časových intervalech, než jsme zvolili my.

U B-buněk zatím nebyla popsána existence paralelní signální cesty podobně jako u makrofágů. Proto jsme provedli amplifikaci buněčné linie A20 infikované *F. tularensis* LVS nebo stimulované *E. coli* LPS, popř. *F. tularensis* LPS s geny pro transkripční faktor IRF-3, kinázu Tbk-1, chemokin IP-10 a cytokin IFN- β a sledovali změny v expresi jednotlivých genů. V 6hodinovém intervalu u buněk infikovaných

F. tularensis LVS byla exprese zvýšená oproti kontrolním buňkám u genu pro IRF-3. Zvýšenou expresi ve 24hodinovém intervalu u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS jsme zaznamenali u genu pro Tbk-1 a také u genu pro IP-10. Naopak sníženou expresi jsme detekovali u buněk infikovaných *F. tularensis* LVS ve 24hodinovém intervalu u genu pro IRF-3 a genu pro IFN- β . Také u této paralelní signální cesty aktivace zřejmě existují odlišnosti od signálních cest popsaných u makrofágů, protože během jednotlivých časových intervalů došlo ke zvýšení exprese pouze některých genů.

Z našich výsledků v rámci měření exprese genů po ovlivnění buněčné linie A20 *F. tularensis* LVS vyplývá, že zřejmě dochází k aktivaci signální cesty vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B a prozánětlivým cytokinům (např. TNF- α), ale také signální cesty, jejíž aktivace vede k transkripčnímu faktoru IRF-3 a chemokinu IP-10.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo metodou reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce zjistit, zda dochází ke změnám v genové expresi makrofágové a B-buněčné linie po infekci intracelulárním patogenem *Francisella tularensis*. Výsledky naší práce jsou následující.

U makrofágové buněčné linie J774 jsme po infekci *F. tularensis* LVS pozorovali snížení exprese genů pro Tbk-1, IRF-3, IP-10 a IFN- β ve 24hodinovém intervalu. Zřejmě tedy dochází vlivem infekce *F. tularensis* k inhibici aktivace transkripčního faktoru IRF-3 a následnému potlačení produkce chemokinů IP-10 a cytokinu IFN- β .

U B-buněčné linie A20 jsme po infekci *F. tularensis* LVS detekovali ve 24hodinovém intervalu zvýšenou expresi genu pro TNF- α . Infekce *F. tularensis* LVS zde patrně aktivuje transkripční faktor NF- κ B a následnou produkci prozánětlivých cytokinů, včetně TNF- α . U B-buněk je zřejmě při infekci *F. tularensis* LVS aktivována také paralelní signální cesta aktivace, protože jsme pozorovali zvýšenou expresi genu pro IRF-3 v 6hodinovém intervalu a genů pro Tbk-1 a IP-10 ve 24hodinovém intervalu. Signální cesty u B-buněk se však mohou lišit od signálních cest popsaných u makrofágů.

6 Použitá literatura

1. Elkins, K.L., Cowley, S.C., Bosio, C.M. (2003) Innate and adaptive immune response to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes and Infection* **3**: 135-142.
2. Sjöstedt, A. (2006) Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes and Infection* **8**: 561-567.
3. McLendon, M.K., Apicella, M.A., Allen, L.A.H. (2006) *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of bioware. *Annual Review of Microbiology* **60**: 167-185.
4. Clemens, D.L., Lee, B.Y., Horwitz, M.A. (2005) *Francisella tularensis* Enters Macrophages via a Novel Process Involving Pseudopod Loops. *Infection and Immunity* **73**: 5 892-5 902.
5. Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., Kwaik, Y.A. (2006) *Francisella tularensis* travels a novel twisted road within macrophages. *Trends in Microbiology* **14**: 37-44.
6. Elkins, K.L., Leiby, D.A., Winegar, R.K., Nacy, C.A., Fortier, A.H. (1992) Rapid generation of specific protective immunity to *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity* **60**: 4 571-4 577.
7. Checroun, C., Wehrly, T.D., Fischer, E.R., Hayes, S.F., Celli, J. (2006) Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14 578-14 583.
8. Clemens, D.L., Lee, B.Y., Horwitz, M.A. (2004) Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infection and Immunity* **72**: 3 204-3 217.
9. Hrstka, R., Kročová, Z., Černý, J., Macela, A., Stulík, J. (2007) *Francisella tularensis* LVS resides in macrophages in a MHC II positive vacuoles with autophagic markers. Zasláno k publikaci.

10. Hrstka, R., Stulík, J., Vojtěšek, B. (2005) The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages. *Microbes and Infection* **7**: 619-625.
11. Lai, X.H., Golovniiov, I., Sjöstedt, A. (2001) *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infection and Immunity* **69**: 4 691-4 694.
12. Mariathasan, S., Weiss, D.S., Dixit, V.M., Monack, D.M. (2005) Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 1 043-1 049.
13. Medzhitov, R. (2005) Toll-like receptors and innate immunity. *International Immunology* **17**: 135-145.
14. Pattern-recognition receptors (including Toll-like receptors) and cytokines. Doc Kaiser's Microbiology Home Page: <http://student.cbcbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/prrecep.html>
15. Sandor, F., Buc, M. (2005) Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biologica* **51**: 188-197.
16. Pitha, P.M. (2004) Unexpected similarities in cellular responses to bacterial and viral invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 695-696.
17. Björkbacka, H., Fitzgerald, K.A., Huet, F., Li, X., Gregory, J.A., Lee, M.A., Ordija, Ch.M., Dowley, N.E., Golenbock, D.T., Freeman, M.W. (2004) The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiological Genomics* **19**: 319-330.
18. Telepnev, M., Golovniiov, I., Grundström, T., Tärnvik, A., Sjöstedt, A. (2003) *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- α and IL-1 from murine macrophages. *Cellular Microbiology* **5**: 41-51.
19. Rajaram, M.V.S., Ganesan, L.P., Parsa, K.V.L., Butchar, J.P., Gunn, J.S., Tridandapani, S. (2006) Akt/protein kinase B modulates macrophage inflammatory response to *Francisella* infection and confers a survival advantage in mice. *The Journal of Immunology* **177**: 6 317-6 324.

20. Mechanisms of bacterial pathogenicity: Endotoxins. Todar's Online Textbook of Bacteriology.
21. Lu, M., Zhang, M., Takashima, A., Weiss, J., Apicella, M.A., Li, X.H., Yuan, D., Munford, R.S. (2005) Lipopolysaccharide deacylation by an endogenous lipase controls innate antibody responses to Gram-negative bacteria. *Nature Immunology* **6**: 989-994.
22. Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* **4**: 837-851.
23. Vinogradov, E., Malcolm, B., Conlan, P., Conlan, J.W. (2002) Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry* **269**: 6 112.
24. Ancuta, P., Pedron, T., Girard, R., Sandström, G., Chaby, R. (1996) Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. *Infection and Immunity* **64**: 2 041-2 046.
25. Culkin, S.J., Rhinehart-Jones, T., Elkins, K.L. (1997) A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *The Journal of Immunology* **158**: 73 277-73 284.
26. Elkins, K.L., Bosio, C.M., Rhinehart-Jones, T.R. (1999) Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infection and Immunity* **67**: 6 002-6 007.
27. Yazawa, N., Fujimoto, M., Sato, S., Miyake, K., Asano, N., Nagai, Y., Takeuchi, O., Takeda, K., Okochi, H., Akira, S., Tedder, T.F., Tamaki, K. (2003) CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood* **102**: 1 374-1 380.
28. Menon, A., Shroyer, M.L., Wampler J.K., Chawan, C.B., Bhunia, A.K. (2003) In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine pathway and human transformed B cells. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases* **26**: 157-174.

29. Kročová, Z., Härtlová, A., Součková, D., Kroča, M., Macela, A., Stulík, J. Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. Zasláno k publikaci.
30. Kato, A., Ogasawara, T., Homma, T., Saito, H., Matsumoto, K. (2004) Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN- β signaling pathway in human monocytes. *The Journal of Immunology* **172**: 6 185-6 194.
31. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R.J. (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *Journal of Leukocyte Biology* **74**: 479-485.
32. TNF- α . Davidson College Immunology Home Page: <http://www.bio.davidson.edu/Biology/Courses/Bio307.html>.
33. Bekker, L.G., Freeman, S., Murray, P.J., Ryffel, B., Kaplan, G. (2001) TNF- α controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *The Journal of Immunology* **166**: 6 728-6 734.
34. Kai, K., Nasu, K., Nakamura, S., Fukuda, J., Nishida, M., Miyakawa, I. (2002) Expression of interferon- γ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* **8**: 176-180.
35. Interferon β . Davidson College Immunology Home Page: <http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Student/spring2000/white/images/ifnbeta.html>.
36. O'connell, R.M., Saha, S.K., Vaidya, S.A., Bruhn, K.W., Miranda, G.A., Zarnegar, B., Perry, A.K., Nguyen, B.O., Lane, T.F., Taniguchi, T., Miller, J.F., Cheng, G. (2004) Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine* **200**: 437-445.
37. Auerbuch, V., Brockstedt, D.G., Meyer-Morse, N., O'Riordan, M., Portnoy, D.A. (2004) Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine* **200**: 527-533.
38. Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Köhler, S., Heesemann, J., Rouot, B. (1998) *Yersinia enterocolica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: Involvement in the induction of programmed cell death and

in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor α production. *The Journal of Experimental Medicine* **187**: 1 069-1 079.

39. Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., Denkers, E.Y. (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B. *The Journal of Immunology* **167**: 2 193-2 201.
40. Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Sirkar, M., Sa, G.S., Das, T., Majumdar, D., Roy, S., Majumdar, S. () *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF- κ B activation in host macrophages via ceramide generation: Involvement of extracellular signal-regulated kinase.

