

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Diplomová práce



Michal Čečrle

ZAVEDENÍ BUNĚČNÉHO MODELU PRO OVLIVNĚNÍ NF- κ B FAKTORU

Introduction of cellular NF- κ B model

Hradec Králové 2018

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“

Na tomto místě bych chtěl poděkovat Prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při tvorbě této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Michal Čečrle

Školitel: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Zavedení buněčného modelu pro ovlivnění NF- κ B faktoru

Nf- κ B je nejdůležitější transkripční faktor zapojený do buněčné signalizace zánětlivých procesů. Podílí se na zánětlivé reakci v různých kompartmentech organismu. Jako transkripční faktor řídí genovou expresi řady genů, především pak cytokinů (tumor nekrotizující faktor alfa, interleukiny: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12; chemokiny aj.)

NF- κ B je také klíčovým faktorem aktivace monocytů a makrofágů.

V této diplomové práci jsem se zaměřil na roli NF- κ B v monocytární buněčné linii THP-1. Tato linie je důležitým modelem lidských makrofágů, do kterých lze linii THP-1 diferencovat. Pomocí dostupné literatury jsem shrnul všechny dostupné poznatky o této problematice. Současně jsem provedl několik experimentů týkající se aktivace NF- κ B v THP-1 linii jako potencionálního modelu při výzkumu a vývoji terapeutického zásahu do NF- κ B signalizace pro potlačení zánětlivých procesů.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Michal Čeřrle

Supervisor: Prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Introduction of cellular NF- κ B model

NF- κ B is the most important transcription factor involved in cell signaling of inflammatory processes. It participates in the inflammatory reaction in the distinct compartments of the living organism. As a transcription factor, it controls the gene expression of many genes, especially cytokines (tumor necrosis factor alfa, interleukins: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12; chemokines etc.).

NF- κ B is also a key factor in the activation of monocytes and macrophages

In this diploma thesis I focused on the role of NF- κ B in the monocyte cell line THP-1. This line is an important model of human macrophages in which the THP-1 line can be differentiated. Using available literature, I summarized all the available knowledge on this issue. At the same time, I conducted several experiments on NF- κ B activation in the THP-1 line as a potential model in the research and development of therapeutic intervention in NF- κ B signaling to suppress inflammation.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Úvod.....	10
2.1.1	Struktura a Rodina NF- κ B	10
2.1.2	Cesty signalizace NF- κ B	14
2.1.3	Genová regulace cytokinů	18
2.2	NF- κ B při zánětu	20
2.3	Vrozená imunita a NF- κ B.....	20
2.4	T-lymfocyty a NF- κ B.....	22
2.5	NF- κ B v regulaci inflamazomu.....	23
2.6	Modely monocytů a makrofágů, THP1 buněčná linie	24
2.7	Terapeutické ovlivnění NF- κ B při zánětu.....	25
2.8	Glukokortikoidy a NF- κ B	27
2.9	Nukleární receptory a jejich ligandy.....	28
2.9.1	Pregnanový X receptor (PXR).....	30
2.9.2	Farnesoid X receptor (FXR).....	34
3	CÍL PRÁCE	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1	Buněčné linie	39
4.1.1	THP-1 – lidská monocytární leukemická linie.....	39
4.1.2	HepG2.....	43
4.2	Výsledky.....	45
4.2.1	Optimalizace transfekce linie THP-1 za nediferencovaného a diferencovaného stavu	45
4.2.2	Ověření funkčnosti plazmidu pNF κ B-luc na linii HepG2.....	45
5	DISKUZE.....	47
6	ZÁVĚR	50
7	LITERATURA.....	51

1 SEZNAM ZKRATEK

AF	Aktivační doména (angl. AF Activation function)
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
BAFF	B-buněčný aktivující faktor
BAFFR	Receptor pro B-buněčný aktivující faktor
BAR	Receptor pro žlučové kyseliny
BCR	B-buněčný receptor
CAR	Constitutive androstane receptor
CD40	Diferenciační skupina 40 (cluster of differentiation)
COX-2	Cyklooxygenáza-2
CYP3A	Cytochrom P450 3A
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DBD	DNA-vazebná doména (DNA binding domain)
Fas	First apoptosis signal
FXR	Farnesoid X receptor
GRE	Glukokortikoidní responzivní element
ICAM	Intercellular adhesion molecule
I κ B	Inhibitor κ B
IKK	I κ B kináza
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LBD	Doména vázající ligand (Ligand binding domain)
LPS	Lipopolysacharid
LT β R	Lymfotoxin beta receptor

MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nukleární faktor κ B
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NOD-like receptor pyrin domain-containing-3
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-like
NR	Nukleární receptor
OATP2	Organic-anion-transporting polypeptide 2
OCA	Obeticholová kyselina (Obeticholic acid)
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
P-gp	P-glykoprotein
PH	parciální hepatektomie
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR	Pattern recognition receptor
PXR	Pregnane X receptor
PXR-RE	Pregnane X receptor responzivní element
RA	Revmatoidní artritida
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RHD	Rel homologní doména
SHP	Small heterodimer partner
SNP s	single nucleotide polymorfism
TAD	Transaktivační doména
TAK1 kinase 1	TGF β -activated kinase 1 = transforming growth factor- β -activated kinase 1

TCR	T-buněčný receptor
Th	T-helper buňka
THP-1	Lidská monocytární buněčná linie
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor nekrotizující faktor α
TNFR	Receptor pro Tumor nekrotizující faktor α
TWEAKR	(TNF) spojený se slabým induktorem apoptózy (TNF-like weak inducer of apoptosis)
ŽK	Žlučové kyseliny (angl. BA Bile acid)

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Úvod

NF- κ B je komplex proteinů, který se nachází téměř ve všech typech živočišných buněk, kde kontroluje transkripci DNA a podílí se na buněčných reakcích na různé podněty, jako jsou bakteriální (např. LPS) nebo virové antigeny. NF- κ B hraje klíčovou roli v regulaci rychlé imunitní odpovědi na infekce, protože patří do kategorie rychle působících primárních transkripčních faktorů přítomných v buňkách v neaktivním stavu, které nevyžadují, aby se aktivovala nová syntéza proteinů. Podílí se také na tvorbě cytokinů a adhezních molekul a reguluje přežití buněk. NF- κ B hraje roli v patogenezi řady zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění střev, roztroušená skleróza, ateroskleróza, systémový lupus erythematosus, diabetes typu I, chronická obstrukční plicní nemoc, astma a dalších (Liu a kol., 2017).

Původně byl objeven v roce 1986 jako jaderný protein v B-lymfocytech, který se selektivně vázal na κ enhancer (krátký úsek DNA o velikosti 50-1500 bází, na který se vážou aktivátory, aby zvýšily pravděpodobnost transkripce daného genu) genu pro lehký řetězec κ imunoglobulinu (Baltimore, 2009).

NF- κ B představuje skupinu indukovatelných transkripčních faktorů, které regulují celou řadu genů zapojených do procesu imunitních i zánětlivých odpovědí. Tato skupina je složena z pěti strukturně příbuzných proteinů: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB a c-Rel, které zprostředkovávají transkripci určitých genů vazbou na specifickou oblast DNA, κ B enhancer, v podobě homo - nebo heterodimerů. NF- κ B proteiny se nacházejí v cytoplazmě a běžně jsou od sebe fyzicky odděleny zvláštní skupinou inhibičních proteinů I κ B (nejvýznamnější I κ B-alfa) a dalšími proteiny obsahující charakteristické tzv. ankyrin repeats. A co více, prekurzorové proteiny p105 (= p50) a p100 (= p52) se chovají podobně jako I κ B inhibitory, protože jejich C-konce se strukturou podobají I κ B a tím pádem mají i inhibiční vlastnost (Liu a kol., 2017).

2.1.1 Struktura a Rodina NF- κ B

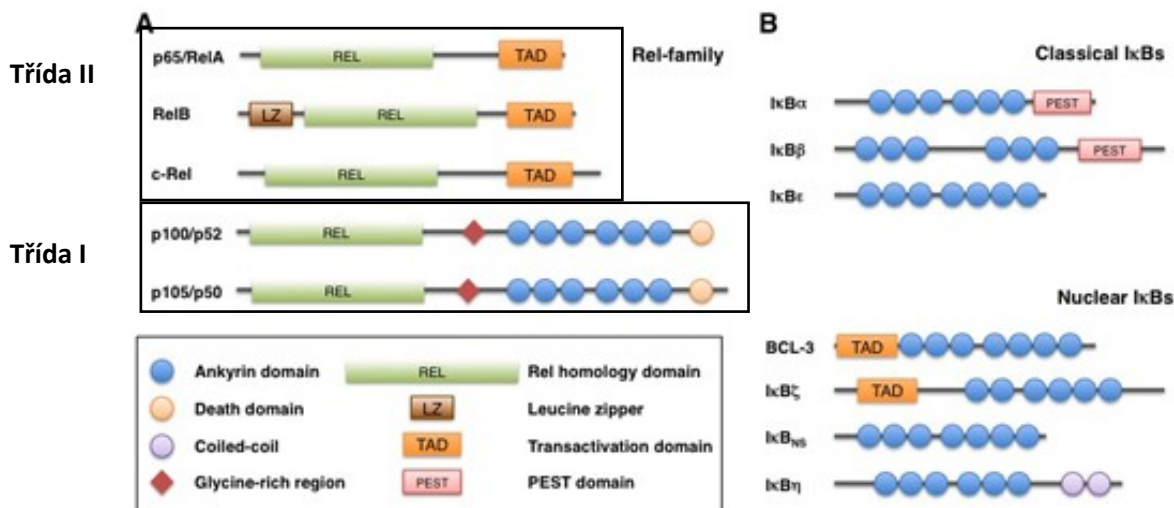
Rodina savčích NF- κ B podjednotek představuje skupinu pěti strukturně příbuzných proteinů, včetně RelA (také nazývaného p65), RelB, c-Rel, p50 (též zvaný NF- κ B1) a p52 (NF- κ B2). Podjednotky p50 a p52 vznikají teprve až po sestříhu z větších prekurzorů p105 resp. p100 ubiquitin-proteázovou cestou.

Všichni členové rodiny NF- κ B obsahují N-terminální doménu s přibližně 300 aminokyselinami nazvanou jako Rel-homologická doména/oblast (RHD/RHR), která zprostředkovává vazbu na DNA a dimerizaci. RHD se skládá ze dvou složených domén, aminokoncové domény (N-doména) a dimerizační, karboxylové domény (C-doména). N-koncová doména interaguje s bázemi DNA specificky a nespecificky s fosfátovou kostrou. C-terminální doména zprostředkovává dimerizaci a nespecifický kontakt s DNA. Prostřednictvím domény RHD interagují různé podjednotky NF- κ B, aby vytvořily různé homo- a heterodimery a vázaly se na κ B sekvence přítomné v promotorových nebo enhancerových oblastech cílových genů.

Každá ze třech podjednotek Rel (RelA, RelB, c-Rel), obsahuje transkripční aktivační doménu (TAD) na C-terminální doméně, potřebnou pro indukci transkripce cílového genu. Dvě podjednotky p50 a p52 postrádají transaktivační domény a mají oblasti bohaté na glycin.

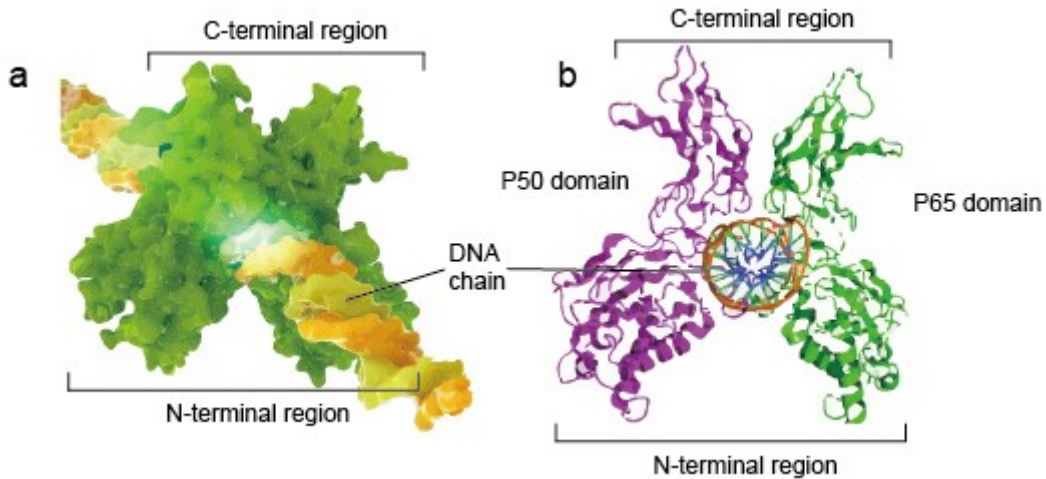
Podjednotky Rel se nacházejí převážně v cytoplazmě navázané na členy rodiny I κ B inhibičních proteinů. V buňkách savců existují tři hlavní inhibiční proteiny: I κ B α , I κ B β a I κ B ϵ .

V současné době je identifikováno sedm I κ B členů rodiny. I κ B lze klasifikovat do tří skupin - *klasických I κ B* (I κ B α , I κ B β a I κ B ϵ), NF- κ B prekurzorů (p105 a p100) a *nukleárních I κ B* (I κ B ζ , Bcl-3 a I κ BNS). Všichni členové rodiny I κ B obsahují charakteristické tzv. ankyrinové repetyce, které jsou odpovědné za interakci s NF- κ B a za jeho inhibici. Tyto „repetice“ interagují s NF- κ B a zabraňují jeho vstupu do jádra a vazbě dimerů NF- κ B na DNA. Každá podskupina I κ B má své vlastní přednostní vazebné partnery NF- κ B (Zhang a Sun, 2015; Perkins, 2007; Zheng a kol., 2010).



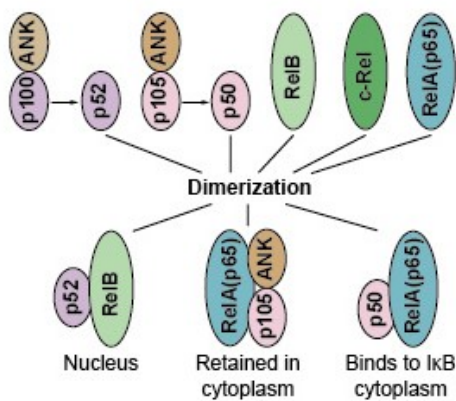
Obr. 1: Rodina Rel/NF-κB

Část A) Rodina Rel seskládá z 5-ti členů. Jejich typickým strukturním znakem je Rel-homologní doména (RHD). Pokud obsahují podjednotky RelA, RelB a c-Rel transkripční doménu (TAD), pak NF-κB obsahující jednu z těchto podjednotek může zahájit genovou transkripci. p50 a p52 se tvoří z prekursorů p105 resp. p100. Kupodivu, tyto jednotky mají ankyrin domény, klasický znak inhibičních IκB proteinů, které se proteolyticky odštěpí po aktivaci NF-κB dráhy. **Část B)** Rodina proteinů IκB se skládá z klasických členů IκBα, IκBβ a IκBε, které se odlišují od neobvyklých členů IκBζ, BCL-3 a IκBNS. Všichni členové sdílejí ankyrinovou doménu, která je zodpovědná za interakci s Rel-homologickou doménou NFκB podjednotek. Na rozdíl od klasických IκBs, neobvyklé IκBs jsou omezeny na jádro a nejsou degradovány po aktivaci NF-κB. Kromě toho jsou indukovatelné a nejsou pouze represory, ale mohou mít také aktivační vlastnosti, např. pro IL-6 (IκBz) a IL-2 (IκBNS) (Modifikováno z publikace Siebenlist a kol. (2005) Nat. Rev. Immunol. a upraveno).



Obr. 2: Struktura dimeru NF-κB vázajícího se na DNA (převzato z creative-diagnostics.com)

Jelikož NF-κB rodina sdílí strukturální podobnost s retrovirovým onkoproteinem *v-Rel*, jsou nazvané NF-κB/Rel proteiny. I když by všichni členové rodiny NF-κB mohly vytvořit až 15 různých dvojic, nejvíce zastoupený dimer je p50/p65, který se nachází v téměř všech typech buněk. Ne všechny kombinace Rel dvojic jsou transkripčně aktivní (převzato z creative-diagnostics.com).



Obr. 3: Homo/hetero dimery NF-κB rodin (převzato z creative-diagnostics.com)

2.1.2 Cesty signalizace NF- κ B

Aktivace NF- κ B zahrnuje dvě hlavní signalizační cesty, **kanonickou** (klasickou) a **nekanonickou** (alternativní). Obě jsou velmi důležité pro regulaci imunitních a zánětlivých odpovědí díky různému mechanismu. Běžným regulačním krokem v obou těchto kaskádách je aktivace I κ B kinázového (IKK) komplexu skládající se z katalytických kinázových podjednotek (IKK α a/nebo IKK β) a regulatorního neenzymatického strukturního (angl. *scaffold*) proteinu NEMO (též jako IKK γ).

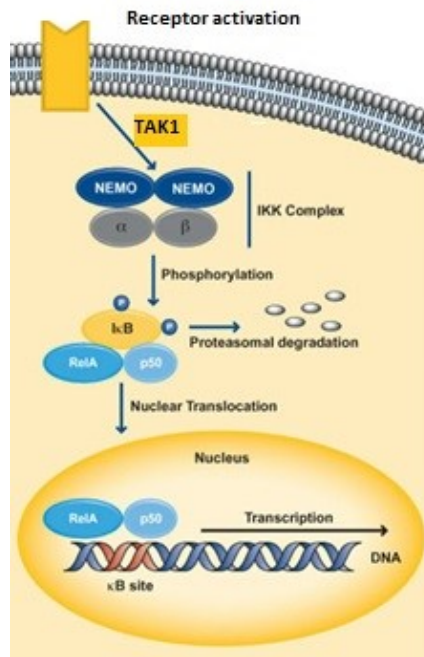
Aktivace NF- κ B dimerů je následkem IKK-zprostředkované fosforylace-indukované proteazomální degradací I κ B umožňující podjednotkám NF- κ B transkripčním faktorům se translokovat do jádra a vyvolat genovou expresi. NF- κ B aktivace vede k expresi I κ B α genu, který funguje jako negativní zpětnovazebná smyčka k odejmutí NF- κ B podjednotek a ukončení signalizace, dokud je přítomna trvalá aktivace signálu.

Kanonická cesta reaguje na různorodou škálu podmětů jako například na ligandy různých cytokinových receptorů, *tzv.* pattern-recognition receptory (PRRs), TNF receptorů (TNFR) i receptorů pro T (TCR) a B-lymfocyty (BCR).

Hlavním mechanismem kanonické cesty (aktivace) je indukovaná degradace I κ B α , jež se odpojí od NF- κ B tak, že se nafosforyluje pomocí kinázy, komplexem podjednotek I κ B (IKK). IKK je složená ze dvou katalytických podjednotek, IKK α , IKK β a řídicí podjednotkou zvanou NF- κ B Essential Modulátor (NEMO, nebo též IKK γ).

IKK může být aktivována prostřednictvím TAK1 (angl. TGF β -activated kinase 1) různě, např. cytokiny, růstovými faktory, mitogeny, částicemi mikrobů a stresovými faktory. Po této aktivaci IKK fosforyluje I κ B α - jeho dvě N-koncové aminokyseliny (seriny), a tím zahájí na ubiquitinu závislou I κ B α degradaci proteasomem vedoucí k rychlému a přechodnému transportu do jádra, především dimerů p50+RelA a p50+c-Rel (Liu a kol., 2017).

Hlavní I κ B jednotkou regulující kanonickou dráhu NF- κ B je I κ B α , protein charakterizovaný svými dynamickými změnami spolu se signálem aktivovanou aktivaci NF- κ B. Po degradaci vyvolaném IKK-zprostředkovanou fosforylací se I κ B α rychle resyntetizuje indukci genové exprese zprostředkovanou NF- κ B, čímž poskytuje mechanismus zpětné vazby k ukončení odpovědi NF- κ B včas (Sun a kol., 1993, Peng a kol., 2010).



Obr. 4: Kanonická cesta (Navázáním ligandu na receptor vede navázání a aktivaci IKK komplexu sestávající se z IKKα a/nebo IKKβ katalytických podjednotek a dvou molekul NEMO. IKK komplex poté fosforyluje IκB vedoucí k její degradaci proteasomem. NF-κB se poté přemístí do jádra, aby aktivoval cílové geny.) Zdroj: <http://www.abcam.com/research-areas/overview-of-nf-κB-signaling>), upraveno

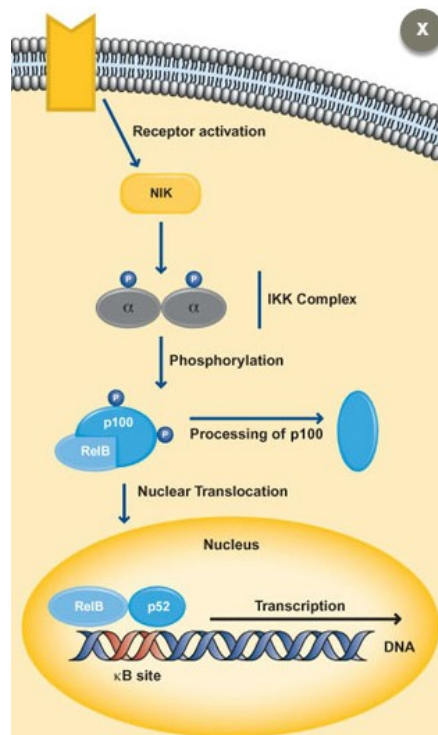
Nekanonická cesta (na rozdíl od kanonické) selektivně reaguje jen na určité ligandy, které se vážou na receptory z nadrodiny TNFR. K nejznámějším receptorům TNF patří např. TNFR1, TNFR2, Fas, LTβR, B-cell activating factor (BAFFR), CD40 a receptor pro aktivátor NF-κB (RANK) a receptor pro „TNF spojený se slabým induktorem apoptózy“ (TWEAKR). Je znám jen malý počet stimulů, které aktivují NF-κB přes tuto cestu a tyto faktory zahrnují lymfotoxin B a B-buňkový aktivující faktor (BAFF).

Kromě toho nekanonická aktivace nezahrnuje degradaci IκB-alfa, ale spíše je závislá na sestřihu podjednotky p100/RelB (což je prekurzor NF-κB2) a za její aktivaci. Hlavní signální molekulou této cesty je NIK (angl. NF-κB-inducing kinase), která se na podnět aktivuje, začne spolupracovat s IKK-alfa, a ta na fosforyluje podjednotku p100 a tato podjednotka se tímto odkáže k ubiquitinaci v proteasomu a sestřihu. Sestřih p100 podjednotky zahrnuje degradaci C-terminální struktury podobné IκB a vyústí ve vytvoření p50 (NF-κB2) podjednotky, která se může přesunout společně s jednotkou RelB jako komplex do jádra.

Funkčně se kanonická cesta zapojuje do téměř všech procesů imunitních reakcí, kdežto u nekanonické aktivace se zdá, že vznikla jako doplňková cesta, která spolupracuje s kanonickou při regulaci získané imunity.

Nejen že NF- κ B reguluje zánět a zprostředkovává indukci různých prozánětlivých genů, ale také reguluje aktivaci, diferenciaci a funkce protizánětlivých T-lymfocytů a nedávne důkazy hovoří i o zapojení NF- κ B do regulace aktivace inflamazomu (proteinový oligomer aktivující prozánětlivé procesy).

Není divu, že neregulovaná NF- κ B aktivace je jasnou známkou chronických zánětlivých onemocnění a tím pádem, že stále lepší a lepší pochopení mechanismů aktivace NF- κ B a jeho prozánětlivé funkce má obrovský význam pro nové terapeutické strategie a léčbu chronických onemocnění (Liu a kol., 2017).



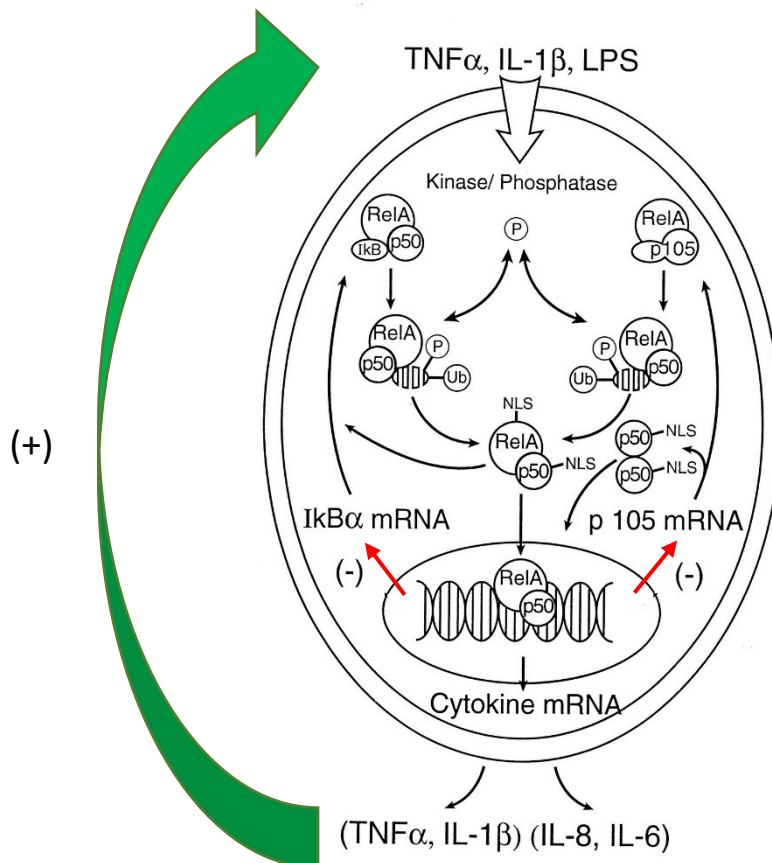
Obr. 5: Nekanonická cesta (Nekanonická cesta začíná vazbou ligandu na receptor, která vede k aktivaci NIK, ten fosforyluje a aktivuje IKK- α komplex, který vzápětí fosforyluje I κ B podjednotky p100 a tím dojde k uvolnění podjednotky p52. Vzniklý heterodimer p52/RelB se následně přemístí do jádra, kde zahájí transkripci cílových genů.) Zdroj: [http://www.abcam.com/research-areas/overview-of-nf- \$\kappa\$ B-signaling](http://www.abcam.com/research-areas/overview-of-nf-κB-signaling)

Tabulka 1: Srovnání kanonické a nekanonické cesty

	Kanonická	Nekanonická
receptory	PRRs TNFRs Cytokinové TCR/BCR	TNF receptory: LTbR – lymfotoxin B RANK TWEK CD40 BAFFR
Délka odpovědi	Rychlá a přechodná	Pomalá a trvalá
Na proteosyntéze	Nezávislá	Závislá
Odpověď na signály	Různé	Podskupina pro TNFR
Funkce	Různé	Specifické
Hlavní signální molekula	TAK1	NIK
Význam pro:	Vrozená imunita a zánět Buněčná proliferace a přežití Buněčná adheze a migrace Vývoj a diferenciacie lymfocytů Zrání dendritických buněk	Růst lymfatických orgánů Osteoklastogeneze Zrání a přežití B buněk Zánětlivá funkce T-buněk

2.1.3 Genová regulace cytokinů

Jelikož je NF- κ B jednoznačně rozhodující regulátor zánětu zprostředkovaného cytokiny, je aktivace NF- κ B přísně kontrolovaný mechanismus. Řízení zpětné vazby aktivace NF- κ B probíhá jak intracelulárně, tak extracelulárně.



Obr. 6: Pozitivní a negativní zpětná vazba v regulaci NF- κ B (Látky jako $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, nebo endotoxin (LPS) spustí vazbou na příslušný receptor signální NF- κ B kaskádu a tím dojde k transkripci cytokinových genů. Dochází k tvorbě cytokinů $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, které mohou pozitivní zpětnou vazbou místně zesílit další aktivaci NF- κ B. Také se stimuluje produkce I κ B- α a p105, kteří inhibují negativní zpětnou vazbou další aktivaci NF- κ B. Zvýšená produkce podjednotky p105 dává přednost tvorbě homodimeru p50, který může taktéž vstoupit do jádra a kompetovat s NF- κ B o svoje vazebné místo.) (Blackwell a kol., 1997, upraveno)

Pozitivní zpětná vazba může nastat pomocí extracelulárních mechanismů, které slouží k zesilování zánětlivých signálů. Aktivace NF- κ B zvyšuje transkripci TNF- α a IL-1 β a oba tyto cytokiny mohou opět aktivovat NF- κ B. Taktéž se může chovat zánětlivý signál, například bakteriální endotoxin, který může zesílit původní zánětlivý signál.

Negativní zpětnou vazbu řídí jak intracelulární, tak extracelulární mechanismy, které jsou odpovědné za omezení aktivity NF- κ B v reakci na daný podnět. Intracelulárně, aktivace NF- κ B vede k transkripční regulaci genů I κ B- α a p105. Zvýšená produkce inhibičních jednotek pomáhá zachytit NF- κ B v cytoplazmě a snižuje množství aktivovaného nukleárního NF- κ B, čímž ukončí novou transkripci cytokinu a omezí zánětlivou odezvu (Blackwell a kol., 1997).

2.2 NF-κB při zánětu

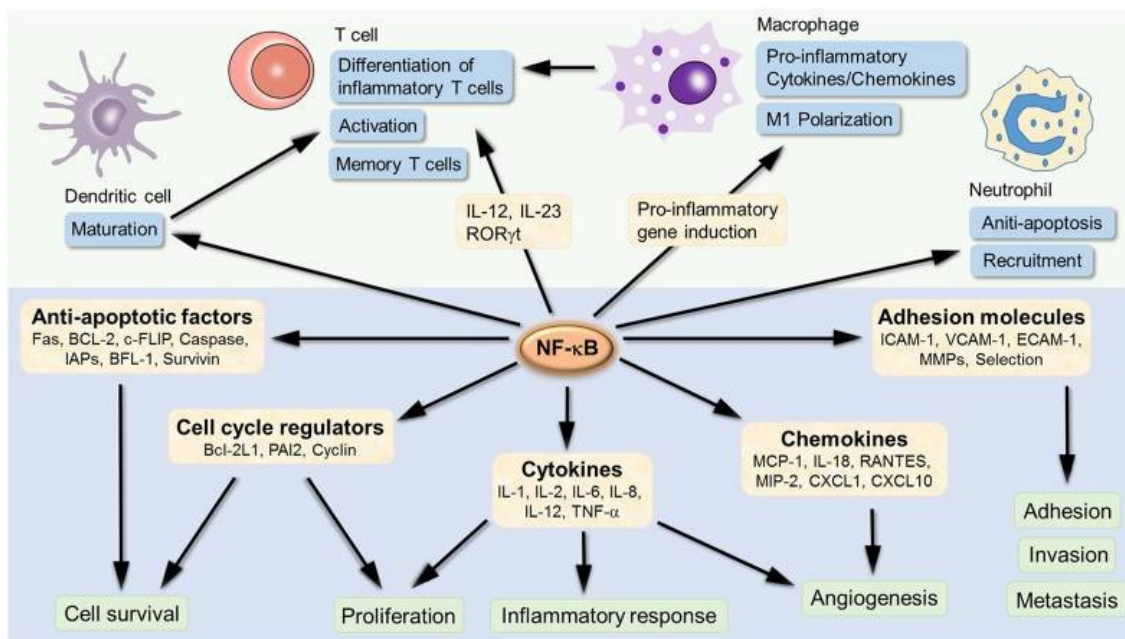
Zánět je obranná reakce organismu na infekci a tkáňové poškození charakterizovanou typickými reakcemi jako je vazodilatace a cílený pohyb imunitních buněk (leukocytů) a plazmových proteinů a tekutiny do místa infekce nebo poškození tkáně. Za normálních okolností je zánět pro organismus prospěšný a hbitě si s ním organismus poradí, avšak špatně regulovaná zánětlivá odpověď může způsobit přemrštěné nebo dlouho trvající poškození tkáně a přispět tak k akutnímu nebo chronickému onemocnění. NF-κB je v této věci hlavním mediátorem zodpovědným za tvorbu prozánětlivých působků a za jejich funkci u vrozené i získané imunity.

2.3 Vrozená imunita a NF-κB

Buňky vrozené imunity, zahrnující makrofágy, dendritické buňky a neutrofilů, jsou důležitými aktéry přirozené imunity a zánětu. Tyto buňky exprimují tzv. Pattern recognition receptor (PRRs) reagující na různé mikrobiální součásti, tzv. „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs).

Tyto PRRs receptory také rozeznávají tzv. „molekulární vzory typické pro poškození vlastních buněk“ (Damage-associated molecular patterns, DAMPs), které se uvolňují z vlastních nekrotických a poškozených buněk. Savčí buňky exprimují pět rodin receptorů PRR. Na základě umístění v buňce se rozdělují na: membránové (Toll-like receptor, TLRs, C-typ lektin-like receptor) a cytoplazmatické (RIG-I-like receptor, NOD-nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NLRs).

U PRR receptorů začíná signalizační kaskáda běžně aktivací kanonické cesty NF-κB, která je zodpovědná za tvorbu prozánětlivých cytokinů, chemokinů, a doplňkových zánětlivých mediátorů v různých typech imunitních buněk. Tyto zánětlivé mediátory se mohou buď zapojit přímo do spuštění zánětu nebo nepřímo podporou diferenciaci zánětlivých T buněk. Další významnou signální molekulou, která se účastní aktivace NF-κB jako reakce na předchozí vazbu s PRR je (TAK1). Po aktivaci TAK1 aktivuje v signalizační kaskádě níže postavené (angl. downstream) kinázy IKK a tím zprostředkovat IκBα fosforylaci a NF-κB aktivaci.



Obr. 7: Různá místa zásahu NF-κB. (Nukleární faktor κB necílí pouze na produkci zánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul, ale i na buněčnou proliferaci, apoptózu a diferenciaci. (Liu a kol., 2017)

Prozánětlivá aktivita NF-κB se nejvíce studuje na makrofázích. V reakci na různé PAMPs a DAMPs se makrofágy rychle aktivují a uvolňují velké množství cytokinů a chemokinů. Za různých odlišných patofyziologických podmínek jsou aktivované makrofágy schopné se diferencovat ve fenotypově různé formy, klasicky aktivovaná (M1) a alternativně aktivovaná (M2) makrofágy.

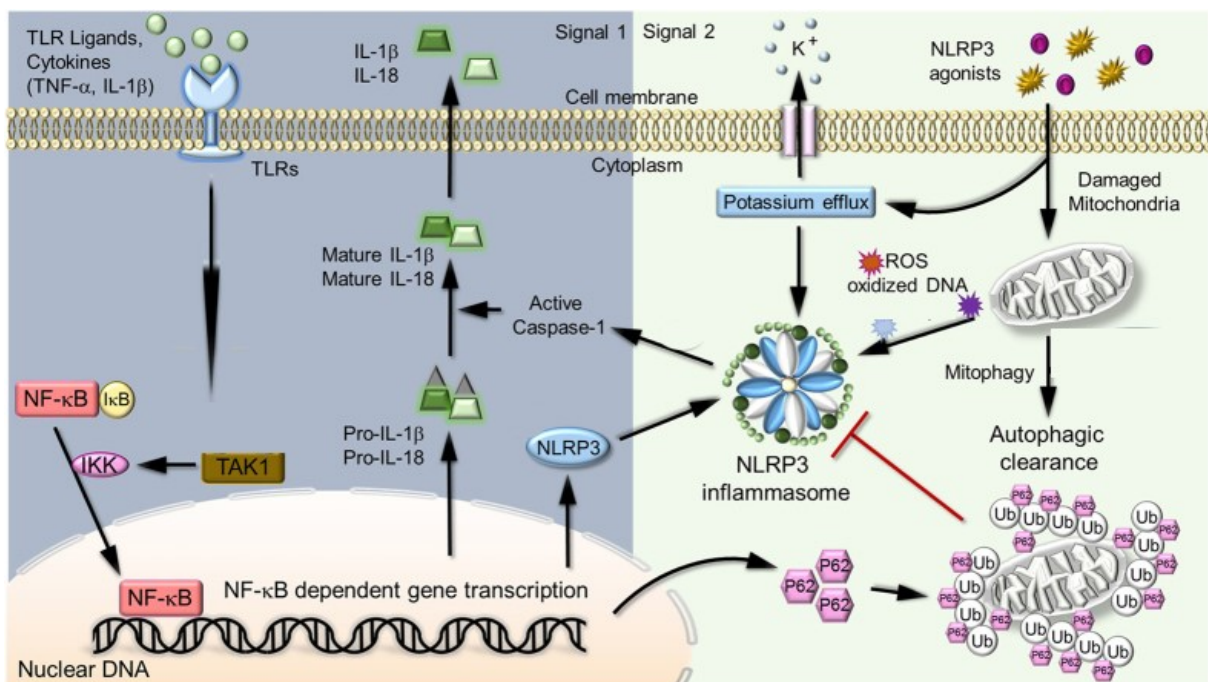
NF-κB je klíčový transkripční faktor makrofágů M1. M1 makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny, jako jsou IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α a chemokiny zapojených do mnohých zánětlivých procesů. M1 makrofágy také podporují diferenciaci zánětlivých T buněk včetně Th1 a Th17, které naopak zánět zprostředkují. Na rozdíl od nich, produkují M2 makrofágy protizánětlivé cytokiny, jako je IL-10 a IL13 (Liu a kol., 2017).

2.4 T-lymfocyty a NF- κ B

Zánět také zahrnuje adaptivní imunitní buňky, zejména T-helper (Th) buňky. Aktivace původních T lymfocytů je zahájena po zapojení T-buněčného receptoru (TCR) specifickým antigenem prezentovaným na buňkách prezentujících antigen, většinou dendritických buněk. Kanonické podjednotky NF- κ B, RelA a c-Rel zprostředkovávají signalizace TCR a naivní aktivace T-buněk. Deregulovaná aktivace NF- κ B může způsobit aberantní aktivaci T-buněk, která je spojena s autoimunitními a zánětlivými odpověďmi. NF- κ B také hraje roli při regulaci diferenciaci a efektorové funkce T-buněk. Po aktivaci se CD4⁺ T buňky diferencují na různé podskupiny efektorových T buněk, včetně Th1, Th2, Th17 a T folikulárních (Tfh) buněk, které vylučují různé cytokiny a zprostředkovávají různé aspekty imunitní odpovědi. Th1 a Th17 buňky jsou obecně považovány za zánětlivé T buňky, protože zprostředkovávají zánětlivé odezvy proti infekcím a samovolným spouštěčům (self-triggers) a jsou spojeny s různými autoimunitními a zánětlivými stavy. Th1 buňky jsou charakterizovány sekrecí IFN- γ , cytokinu, který jednak podporuje buněčnou imunitu, tak se i podílí na zánětlivých procesech. NF- κ B podporuje diferenciaci Th1 buněk regulací signalizace TCR stejně jako fungováním ve vrozených imunitních buňkách ke zprostředkování indukce cytokinů, jako je IL-12, které podporují Th1 diferenciaci. Buňky Th17 jsou charakterizovány sekrecí IL-17, zánětlivým cytokinem, který přitahuje monocyty a neutrofile do místa zánětu v reakci na invazi na patogenní nebo sobě vlastní antigeny (self-antigen). Diferenciaci CD4⁺ T buněk je regulována cytokiny vylučovanými buňkami prezentujícími antigen a jinými vrozenými imunitními buňkami a vnitřními faktory T-buněk (Liu a kol., 2017).

2.5 NF- κ B v regulaci inflamazomu

Inflamazom je skupina intracelulárních komplexů s více bílkovinami uspořádaných k sobě v reakci na PAMP a DAMP a charakterizovaný aktivací zánětlivých kaspáz (kaspáza-1). Inflamazomové receptory po stimulaci oligomerizují a aktivují kaspázu 1. Aktivovaná kaspáza 1 pak štěpí pro-IL-1 β a pro-IL-18 do svých zralých forem, což vede k sekreci těchto prozánětlivých cytokinů. Inflamazomy tvoří nedílnou součást vrozené imunity proti patogenním infekcím. Deregulovaná aktivace inflamazomu přispívá k různým autoimunitním a zánětlivým onemocněním včetně neurodegenerativních onemocnění (roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba) a metabolických poruch (ateroskleróza, diabetes typu 2 a obezita) (Guo a kol. 2015). Signální dráha NF- κ B se podílí na regulaci inflamazomu, což přispívá k zahájení a rozvoji zánětlivých onemocnění (Liu a kol., 2017).



Obr. 8: NF- κ B v regulaci NLRP3 inflamazomu. (Pro aktivaci NLRP3 inflamazomu je zapotřebí dvou signálů: tzv. primingu a aktivace. Prototypovým příkladem prvního primingového signálu je bakteriální vazba LPS na TLR4, což vede k aktivaci signalizace NF- κ B. Aktivní NF- κ B podporuje v jádře transkripci genů jako jsou NLRP3, Pro-IL-1beta a Pro-IL-18. Druhým signálem aktivace inflamazomu jsou agonisté NLRP3, které aktivují NLRP3 k tvorbě inflamazomu. NF- κ B indukuje zpožděnou akumulaci autofágického receptoru p62, který se může specificky vázat na mitochondriální poly-ubikvitinové řetězce, a tudíž negativně regulovat aktivaci inflamazomu prostřednictvím mitofágické eliminace. (Liu a kol., 2017, upraveno)

2.6 Modely monocytů a makrofágů, THP1 buněčná linie

Monocyty cirkulující v krvi poskytují významnou ochranu vůči Gram negativním bakteriím. Poté co tyto bakterie rozpoznají, respektive jejich toxiny (LPS), mění se na dendritické buňky nebo na tkáňové makrofágy využívající fagocytózu. Monocyty a makrofágy patří tedy do přirozené imunity (Sallusto a Lanzavecchia, 2010).

THP-1 představují buněčnou linii pocházející z periferní krve jednoho ročního chlapce postiženého akutní monocytární leukémií.

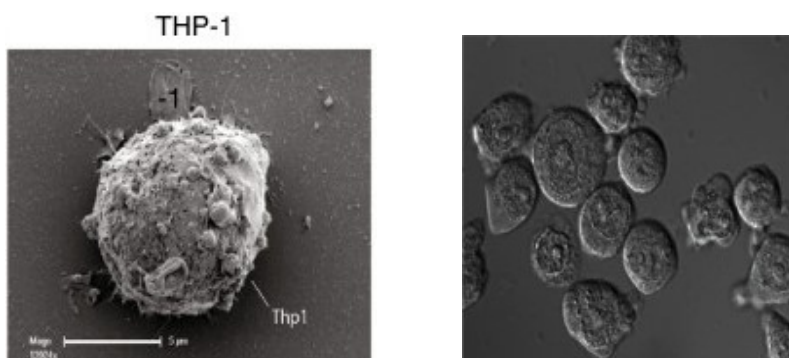
THP-1 buňky poskytují cenný nástroj pro zkoumání in vitro monocytární/makrofágové struktury i funkce, mechanismů, signalizačních cest i transportu léčiv a potravních látek ve zdraví i nemoci.

Jsou vhodné jako příjemce transfekce DNA vektorů pro experimentální ovlivnění genové exprese. Uchovávají se v kapalném dusíku.

THP-1 skýtá oproti původním buňkám některé výhody:

- rychlejší buněčné dělení
- žádné důkazy o toxicitě buněk, manipulace s nimi je tudíž bezpečná
- nepodléhají tak rychle apoptóze, jsou jakoby „nesmrtelné“
- jednodušeji se uchovávají, např. v tekutém dusíku
- stálá genetická výbava
- nehrozí kontaminace ostatními složkami krve při odběru

Dnes již existují i komerčně dostupné THP-1 buňky speciálně navržené pro sledování NF- κ B signalizace i za podmínek nízké koncentrace aplikovaných PRR agonistů (např. PAMP, které zahrnují kupříkladu LPS), které spouštějí NF- κ B kaskádu a jeho aktivací způsobí genovou expresi, která vede k zánětlivé odpovědi, proliferaci buněk, diferenciaci, migraci a buněčnému přežití (Chanput a kol., 2014).

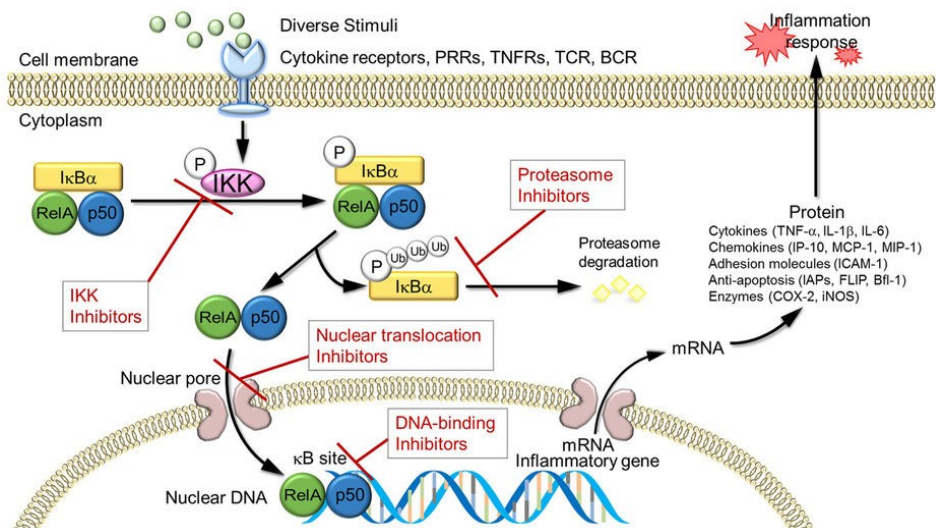


Obr. 9: Morfologická struktura THP1 buněk (Osier a kol., 2014, upraveno)

2.7 Terapeutické ovlivnění NF- κ B při zánětu

Dnes už se ví, že NF- κ B slouží jako centrální zánětlivý mediátor, který odpovídá na širokou škálu receptorů spojených s imunitou. Vzhledem k deregulované aktivaci NF- κ B, která se podílí na různých zánětlivých onemocněních se zacílení do protizánětlivé léčby jeví jako atraktivní přístup. Podařilo se vyvinout několik kategorií inhibitorů, které blokují různé kroky signalizace NF- κ B. Zvýšený počet selektivních IKK inhibitorů byl navržen tak, aby blokoval katalytickou aktivitu IKK a zabránil I κ B α fosforylaci.

Dobře známé látky jako acetylsalicylová kyselina a salicyláty, mají rovněž schopnost inhibovat IKK. Inhibitory proteasomu, jako je např. Bortezomib, blokuje I κ B α degradaci v proteasomu. Dále sem náleží blokátory nukleární translokace různých NF- κ B podjednotek, (takrolimus (FK-506), léčiva, která inhibují aktivitu NF- κ B při vazbě na DNA, jako jsou glukokortikoidy a agonisté PPAR receptorů. I přes dosažení významného pokroku při navrhování přístupů k inhibici NF- κ B, existují překážky pro vývoj klinicky dostupných léků na bázi NF- κ B. Inhibice NF- κ B může být sice přínosem při léčbě zánětlivých onemocnění, existují ale otázky týkající se rovnováhy mezi účinností a bezpečností, jelikož funkce NF- κ B je také nutná pro udržení normální imunitní odpovědi a přežití buněk. Hromadící se studie naznačují, že rozsáhlá inhibice signalizace NF- κ B může způsobit závažné nežádoucí účinky. Z tohoto vyplývá, že lepší pochopení mechanismu účinku u konkrétní nemoci je zásadní při hledání specifických látek pro léčbu zánětlivých onemocnění. (Liu a kol., 2017)



Obr. 10: Terapeutické blokátory zacílené na NF-κB aktivitu. (Liu a kol., 2017)

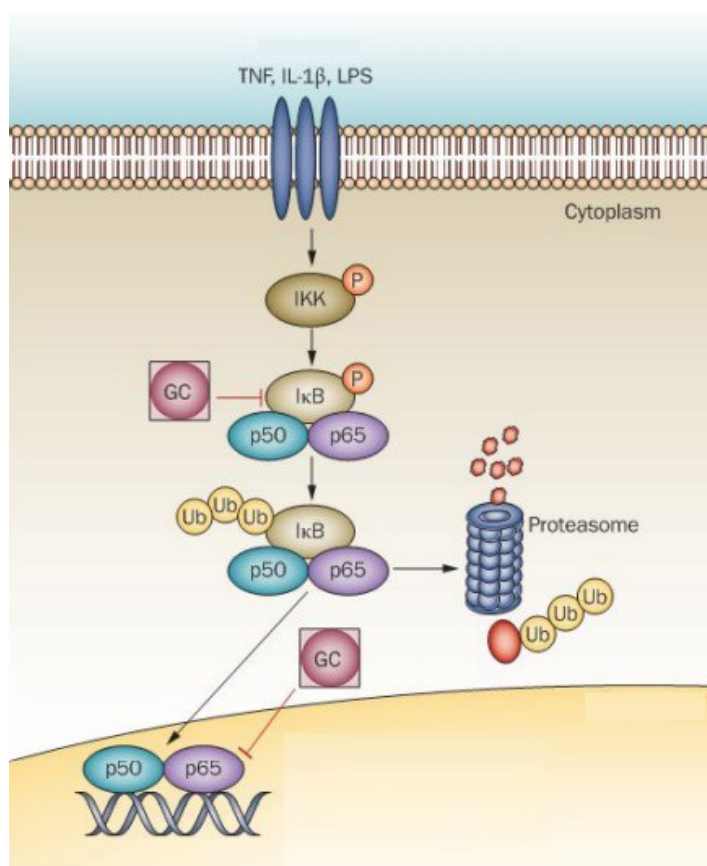
1. Inhibice IKK kinázy a tím zamezení fosforylace IκBα (aspirin, salicyláty)
2. Inhibice proteasomu, zamezení degradace IκBα (bortezomid, laktacystin)
3. Inhibice transportu do jádra (takrolimus)
4. Inhibice vazby na DNA, inhibice transkripce (glukokortikoidy, agonisti PPAR)

2.8 Glukokortikoidy a NF- κ B

Glukokortikoidy (GCs) se široce využívají k potlačení chronického zánětu např. u astma, revmatoidní artritidy, nemoci střev a autoimunitních onemocnění a všechna tato onemocnění jsou spojena se zvýšenou expresí zánětlivých genů. GCs se v cytoplazmě vážou na svůj glukokortikoidní receptor a poté se přesouvají do jádra, kde se můžou navázat na GC response element (GRE) na regulovaném genu a tím zahájit transkripci tohoto genu (Barnes, 1998).

Využívají se také jako imunosupresiva. Inhibují syntézu téměř všech cytokinů potřebných pro imunitní reakce. Zjistilo se, že GCs potlačují aktivitu NF- κ B dvěma na sobě nezávislými mechanismy účinku. První spočívá v indukci transkripce genu pro inhibitor NF- κ B (I κ Ba). To vede ke zvýšené syntéze inhibitoru I κ Ba, který reaguje s aktivovaným NF- κ B a tím přerušuje jeho cestu.

Druhým z mechanismů je vazba glukokortikoidního receptoru s GC na p65 podjednotku a tvorbě neaktivního komplexu (Wissink a kol., 1998).



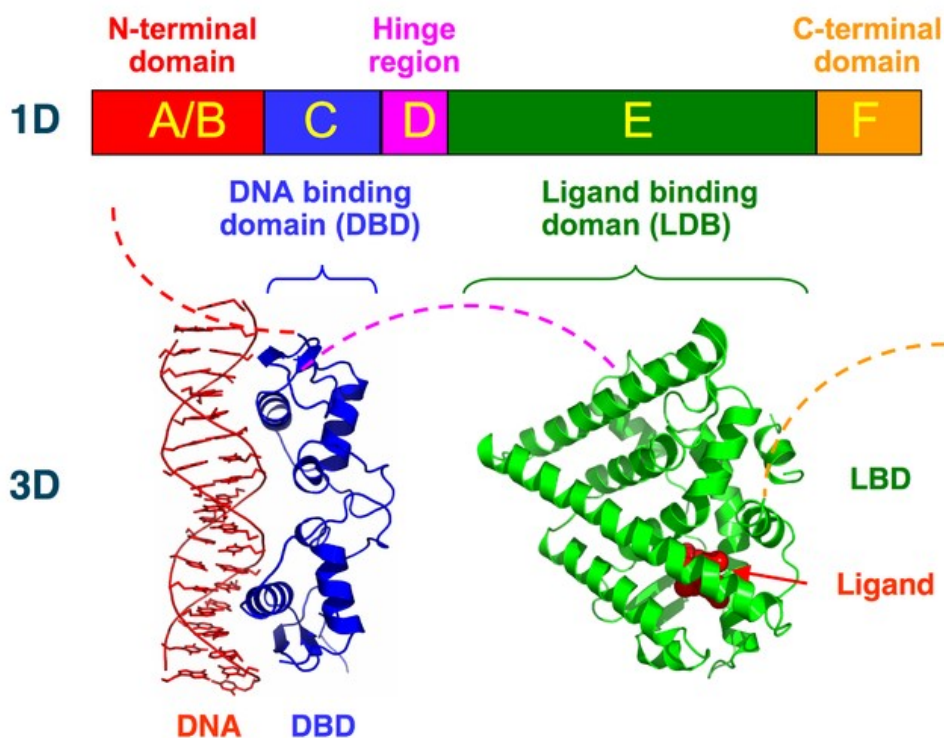
Obr. 11: Mechanismus účinku GCs. (GCs zprostředkovávají terapeutický efekt produkcí I κ B a také přímým potlačením podjednotky p65, která zahajuje transaktivaci. Hanaoka, 2012, upraveno)

2.9 Nukleární receptory a jejich ligandy

Organismus je často vystavován xenobiotikům jako jsou léčiva a environmentální chemikálie, které mají velký vliv na lidské zdraví. Pro modulaci metabolismu a exkrece xenobiotik, mění transkripci široké škály genů exprimovaných v řadě tkání a životně důležitých orgánech jako jsou játra, ledviny, střeva, plíce, mozek, placenta a pankreas. Aktivací struktur označovaných jako nukleární receptory se dá regulovat genová exprese a ta je podstatou indukčního působení léčiv a hormonálního účinku steroidních hormonů. Nukleární receptory tak ovlivňují expresi biotransformačních enzymů I. a II. fáze metabolismu, transportních proteinů na úrovni transkripční regulace genů. Pro detoxifikaci organismu jsou zásadní pregnanový nukleární receptor X (PXR) (a mimo jiné i konstitutivní androstanový receptor, CAR, farnesoid X receptor, FXR). V organismu se nicméně nachází více než 70 různých nukleárních receptorů (Pávek a kol., 2005).

Nukleární receptory jsou tvořeny 4 proteinovými podjednotkami. První podjednotka je modulátorová doména, která interaguje s modulačními proteiny (koaktivátory), někdy se označuje jako aktivační doména (AF). Některé nukleární receptory mají jednu, některé dvě AF jednotky na C i N konci proteinu. Druhou je konzervativní doména schopná rozpoznat specifické sekvence genů promotorové DNA (DBD – DNA binding domain) a tím určí, které geny budou regulovány. Třetí strukturou je spojovací část (tzv. Hinge region) a poslední doména, která váže ligand (LBD – ligand binding domain). Ta vytvoří obal, ve kterém ligandy reagují s LBD doménou prostřednictvím aminokyselinových skupin na základě jejich prostorového uspořádání. Navíc mimořádná flexibilita ve velikosti a tvaru LBD poskytuje základ pro celou řadu nukleárních receptorů, které jsou tak schopny pojmout velké množství ligandů s rozmanitou chemickou strukturou. (Pávek a kol., 2005, Tolson a Wang 2010).

Obvykle všechny tyto receptory mají relativně kompaktní LDB a jsou schopné vázat unikátní vysoce afinitní endogenní ligandy ve velmi malých (nanomolárních) koncentracích. Tento přístup vedl k identifikaci skupiny proteinů, které se na základě struktury a sekvence podobají nukleárním receptorům, ale nemají určené vlastní přirozené ligandy. Tyto NR, primárně označené jako „sirotčí receptory“, jsou skupinou NR, která tvoří přibližně 60% z více než 70 odlišných členů nadrodiny NR. Dostupnost tohoto velkého počtu sirotčích receptorů umožnila posunout klasickou endokrinologii k tzv. „reverzní endokrinologii“. Místo použití čistého hormonu k identifikaci jeho receptoru, byly rozpoznány nové bioaktivní molekuly jako selektivní ligandy těchto receptorů. Tímto se sirotčí receptory nazvaly jako „adoptované“ (Tolson a Wang, 2010).



Obr. 12: Ilustrační znázornění struktury nukleárního receptoru

(Obrázek ukazuje schematickou sekvenci v 1D aminokyseliny jaderného receptoru a ve 3D struktury DBD (vazba na DNA) a LBD (vazba na ligand) oblasti jaderného receptoru. Experimentální struktury N-terminální domény (A/B), kloubové oblasti (D) a C-terminální domény (F) jsou pouze znázorněny čárkovaně červenými, purpurovými a oranžovými čarami.)

Zajímavé je, že většina ligandů sirotčích a adoptovaných receptorů jsou xenobiotika včetně léčiv, karcinogenů, potravinářských přidaných látek, pesticidů a polutantů životního prostředí. Fungují jako senzory toxických (xenosenzory) produktů odvozených od endogenních a exogenních chemických látek, a proto je tento velký počet receptorů také označován jako xenobiotické receptory. Ty zahrnují (ale nejsou omezeny na): farnesoid X receptoru (FXR), konstitutivní androstanový aktivní receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR) a aryl hydrocarbon receptor (AhR, ten však nepatří do superrodiny NR) (Tolson a Wang, 2010).

PXR (Pregnane X receptor) a FXR (farnesoid X receptor) jsou nukleární receptory, které spojuje přítomnost transkripčních faktorů (např. NF-κB) charakterizované místem vážící určitý ligand.

2.9.1 Pregnanový X receptor (PXR)

Pregnanový X receptor (PXR, NR1I2) je protein složený z 434 aminokyselin. V roce 1998 tři výzkumné skupiny nezávisle na sobě izolovaly cDNA dekodující nový sirotčí receptor PXR, u kterého byla následně prokázána centrální role v transkripční regulaci CYP3A genů u více druhů. Než byl označen jako NR1I2, byl nazván SXR (steroidní a xenobiotický receptor) a PAR (pregnanem aktivovaný receptor) u lidí. To odpovídalo jeho následné identifikaci všestrannosti při rozpoznávání široké škály syntetických steroidů a xenobiotik (Tolson a Wang, 2010).

Pregnanový X receptor náleží do skupiny ligandem aktivovaných transkripčních faktorů označovaných jako tzv. nukleární receptory, které se účastní mnoha fyziologických a patologických dějů v organismu.

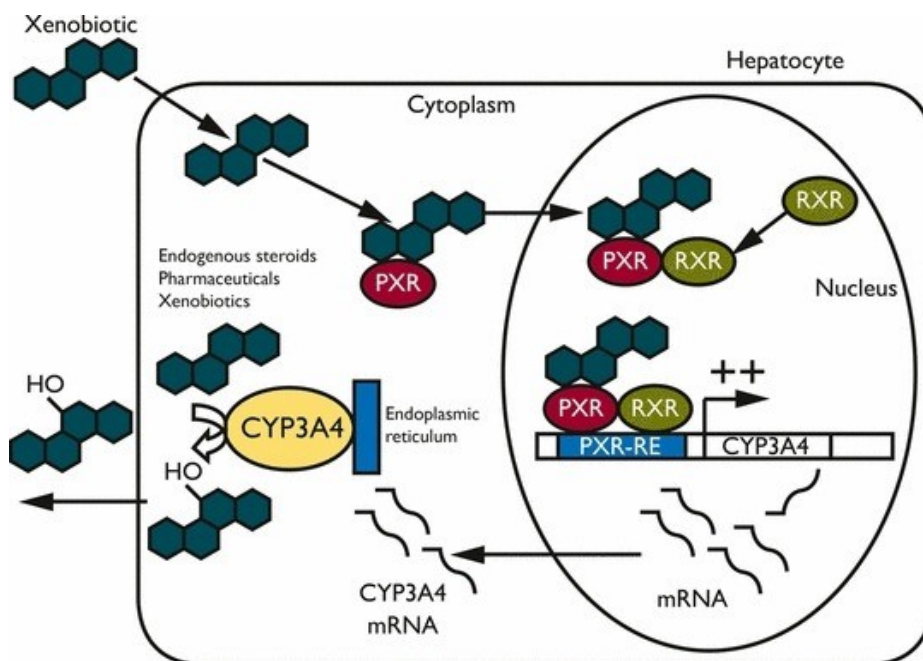
Pregnanový X receptor se nenachází především v jádře, ale také se vyskytuje v cytoplasmě a z cytoplazmy se může přesunout během aktivace do jádra. Nejvíce se nachází v játrech, dále v tenkém střevě, žaludku a v ledvinách. Právě tento výskyt se odvíjí od exprese cytochromu CYP3A4 i P-glykoproteinového transportéru.

Jeho aktivace začíná přímou vazbou na ligand v jádře. Poté receptor vytvoří dimer s dalším receptorem, retinoidním receptorem RXR α a společně rozpoznávají určité oblasti promotorové DNA regulovaných genů nazvaných jako responzivní sekvence PXR-RE (PXR response element). U nejdůležitější biotransformačního cytochromu P450 CYP3A4 léčiv a xenobiotik se našla dvě vazebná místa v promotorové regulační oblasti genu CYP3A4 – proximální a distální – společně spolupracují pro maximální indukční účinek (Pávek a kol., 2005).

Hlavním úkolem PXR je reagovat na přítomnost cizích látek a tím aktivovat tvorbu proteinů zodpovídajících za jejich detoxikaci z organismu. Mezi jeho ligandy patří mnoho látek z řad agonistů jak endogenních, tak exogenních (např. steroidy, antimykotika, žlučové kyseliny, rostlinné látky aj.), tak i antagonistů (např. ketokonazol) (Pávek a kol., 2005).

Dále k nejfrekventovanějším ligandům PXR patří léčiva terapeutických skupin (např. klotrimazol, lovastatin, nifedipin), přírodní sedativum hyperforin, některé toxiny i endogenní steroidy. Svou chemickou strukturou a svými fyzikálně-chemickými vlastnosti jsou velmi různorodou skupinou látek, a tímto se PXR dosti odlišuje od jiných nukleárních receptorů, které jsou spíše aktivovány svým specifickým ligandem (estrogenní receptor, receptor pro vitamín D, receptor hormonů štítné žlázy). Díky této své ligandové pestrosti i množstvím regulovaných biotransformačních enzymů a

lékových transportérů je PXR jeden z nejdůležitějších aktérů ve farmakokinetice léčiv (Pávek a kol., 2005).

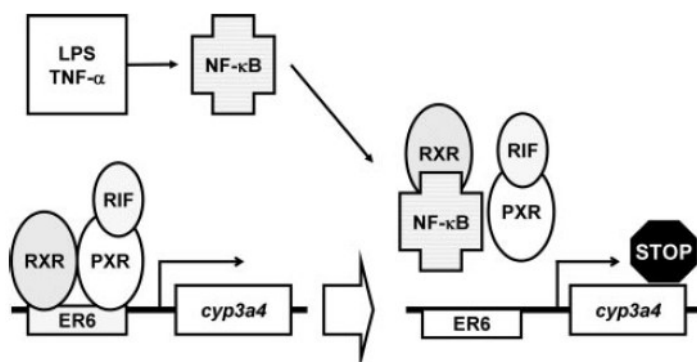


Obr. 13: Schéma vyjadřující aktivaci PXR xenobiotikem vedoucí k indukci cytochromu CYP3A4. (Tompkins a Wallace, 2007)

U tohoto receptoru je typická tzv. autoindukce, tzn. že léčiva (např. karbamazepin) nebo jejich metabolity mohou být induktory (autoinhibice) metabolické cesty, kterou se sami eliminují a tím eliminaci urychlí. V terapii to znamená pokles koncentrace léčiva v plazmě. Pak takováto úprava dávek daného léčiva je složitá a je zapotřebí neustále monitorovat hladinu léčiva.

PXR reguluje celou řadu genů pro enzymy I. a II. fáze biotransformace. Mezi nejdůležitější izoenzymy cytochromu P-450, který je zapojen do biotransformace více než 50% léčiv používaných v humánní medicíně je enzym CYP3A4 (další např. CYP2C9, 2C19, sulfonyltransferázy, transportér: P-glykoprotein, MRP2, OATP2). Právě formy CYP3A4, 2C9 a 2C19 tvoří až 80% veškerých izoforem P-450 v játrech a střevě a zprostředkovávají většinu reakcí I. biotransformační fáze léčiv. Významně také ovlivňují lékové transportéry, především P-glykoprotein, který transportuje desítky léčiv, a tím se stává významným prostředníkem závažných klinických lékových interakcí. Má se za to, že genetický polymorfismus PXR, nikoli enzymu CYP3A4, stojí za interindividuální variabilitou metabolismu léčiv. Polymorfismus je dán přítomností bodových mutací DNA (tzv. SNP, Single Nucleotide Polymorphism) (Pávek a kol., 2005).

Už delší dobu je známo, že zánět a infekce snižují metabolismus léčiv u lidí. Cytochrom CYP3A4 je regulovaný genovou transkripcí receptorem PXR, který je závislý na vazbě s příslušným ligandem. Aktivace NF- κ B například lipopolysacharidem (LPS) nebo TNF- α hraje zásadní roli v potlačení exprese CYP3A4 díky interakci mezi NF- κ B s komplexem PXR-retinoid X receptorem (RXR). Inhibice NF- κ B specifickým supresorem SRI κ B α (super represor I κ B α) zvrátila potlačení exprese CYP3A genu lipopolysacharidem a TNF α faktorem. Navíc, podjednotka NF- κ B p65 je schopná rozrušit spojení komplexu PXR-RXR α se sekvencí DNA, DNA-vazebnou doménou pro RXR α . Takto se odkryl mechanismus účinku pro inhibici syntézy CYP3A4 prozánětlivými látkami (např. LPS, TNF- α) (Gu a kol., 2006).



Obr. 14: Schématická ilustrace znázorňující potlačení genové exprese CYP3A4 faktorem NF- κ B. Po aktivaci NF- κ B faktoru TNF- α nebo LPS se podjednotka p65 přesune do jádra a přeruší vazbu heterodimeru PXR-RXR α vazbou na RXR a tím potlačí expresi cytochromu CYP3A4 (RIF, rifampicin) (Gu a kol., 2006).

Další studie z roku 2013 ukázala, že přírodní flavonoid chrysin (protizánětlivá látka), jakožto agonista PXR receptoru dokázal snížit tvorbu cílových genů NF- κ B (iNOS, ICAM-1, COX-2, TNF- α , IL-6) v mukóze střeva. Inhiboval degradaci I κ B α a tím bránil aktivaci NF- κ B a rozvoji zánětu (Dou a kol., 2013).

Studie, která se zabývala aktivátorem PXR (cyklosporin A), u chronického zánětlivého onemocnění jater jako je primární biliární cirhóza, potvrdila, že aktivace PXR receptoru (a s tím spojená inhibice NF- κ B) podporuje růst hepatocytů a je rovněž antifibrinogenní. Tím pádem může být PXR receptor vynikajícím cílem léčby u chronického zánětlivého jaterního onemocnění. Studie se prováděla na THP-1 buněčné linii a hepatocytech izolovaných z myších jater (Wallace a kol., 2010).

Další nedávná studie ukázala, že PXR aktivace zlepšuje zánětlivé onemocnění tlustého střeva na myším modelu pomocí inhibice exprese cílových genů pro NF- κ B. Účinky jsou protektivní, ale mechanismus není objasněn. Naproti tomu, tento účinek nebyl prokázán na tzv. PXR null myších, tedy myších geneticky upravených bez PXR receptoru. Jako ligand PXR byl v této studii použit pregnenolon-16 α -karbonitril, což je ligand myšního PXR receptoru (Shah a kol., 2006).

Zatímco je již dlouho známo, že zánět a infekce snižují expresi genů jaterních cytochromů P450 (CYP), které se podílejí na metabolismu xenobiotik a že expozice xenobiotickým chemikáliím může narušit imunitní funkci, molekulární mechanismy, které jsou základem obou těchto jevů, zůstaly neznámé. Studie provedená na myších ukázala, že aktivace nukleárního PXR inhibuje aktivitu NF- κ B, klíčového regulátoru zánětu a imunitní odpovědi. Bylo také prokázáno, že NF- κ B cílové geny jsou indukovány a zánět tenkého střeva je významně zvýšený u myší postrádajících PXR, což ukazuje přímou reciproční vazbu mezi PXR a antagonismem NF- κ B zprostředkovaným léčivou aktivující PXR (Zhou a kol., 2006).

2.9.2 Farnesoid X receptor (FXR)

Farnesoidní X receptor, také známý jako receptor pro žlučové kyseliny (bile acid receptor - BAR) či NR1H4 (nukleární receptor podrodiny 1 skupiny H člen 4). FXR byl původně označen jako farnesolem aktivovaný receptor interagující s RXR. K expresi FXR dochází u člověka z jediného genetického místa (chromozom 12q23.1).

FXR se vyskytuje ve vysokém množství v játrech, ve střevě, v ledvinách a nadledvinách. Kyselina chenodeoxycholová a další žlučové kyseliny (ŽK) jsou přirozenými ligandy pro FXR. Je známo, že zásadně ovlivňuje tvorbu žluče a enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin. Nejdůležitější ŽK interagující s FXR jsou: chenodeoxycholová, deoxycholová, cholová, lithocholová a další. Dalšími agonisty jsou: semisyntetická obeticholová ŽK a diterpen kafestrol. FXR zásadním způsobem řídí homeostázu ŽK, metabolismus lipoproteinů a glukózy, regeneraci jater, karcinogenezi, růst střevních bakterií a reaguje na hepatotoxiny. (Li a Guo, 2015)

Jednou z primárních funkcí aktivace FXR je potlačení enzymu syntézy ŽK- cholesterol 7 alfa-hydroxylázy (CYP7A1), enzymu, který má klíčovou roli v metabolismu cholesterolu. Přeměňuje cholesterol na 7-alfa-hydroxycholesterol, což je první syntetický stupeň řídicí syntézu žlučových kyselin. FXR se přímo neváže na promotor CYP7A1. FXR spíše indukuje expresi malého heterodimerového partnera (SHP), který pak funguje na inhibici transkripce genu CYP7A1. Tímto způsobem je vytvořena cesta negativní zpětné vazby, při které je syntéza žlučových kyselin inhibována, když jsou v organismu vysoké hladiny těchto kyselin.

Rovněž bylo zjištěno, že FXR je důležitý při regulaci hladin triglyceridů v játrech (Jiao a kol. 2015).

Játra jsou jedinečným orgánem s vysokou regenerační schopností, která by mohla dát vzniku nové jaterní tkáně a její funkci např. po poranění z ischemie nebo resekce části jater. Podstatné molekulární mechanismy regenerace jater byly v minulosti rozsáhle studovány pomocí modelu parciální hepatektomie (PH) u hlodavců, kde se 2/3 PH prováděly odstraněním dvou laloků. Celý proces regenerace jater je komplikovaný, zahrnující mnoho souvisejících interakcí, která zůstávají ne zcela pochopitelné. ŽK a FXR nejen vzájemně spolupracují, ale také regulují různá cíle nezávisle na regeneraci jater. Nedávné poznatky navíc naznačují, že tkáňově specifický FXR významně přispívá také k regeneraci jater. Tato nová zjištění naznačují, že FXR má mnohem širší úlohu než regulace metabolismu ŽK, cholesterolu, lipidů a glukózy. Tímto se myslí, že FXR je

důležitým cílem farmaceutického výzkumu pro potenciální využití ligandů FXR pro regulaci regenerace jater v medicíně (Li a Guo, 2015).

FXR receptor je také exprimován v lidské placentě, i když zatím s nejasnou funkcí. Ve studii Yuan a kol. (2016), která se prováděla na březích myších se po intraperitoneálním podání LPS a OCA objasnil zřejmě jeden z významů FXR zprostředkované protizánětlivé aktivity v placentě. FXR signální kaskáda se podle očekávání spustila pomocí OCA. OCA navodila ochranu proti LPS navozené fetální smrti. Také snížila mimo jiné sníženou hmotnost plodu navozenou LPS. Další experimenty ukázaly, že OCA inhibuje syntézu TNF- α vyvolanou aplikací LPS v mateřském séru a plodové vodě. Kromě toho OCA výrazně snížila zvyšování placentárních prozánětlivých genů indukovaných LPS, včetně TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 a dalších. Naproti tomu OCA zvýšila protizánětlivý cytokin IL-10 v mateřském séru, plodové vodě a placentě. Další analýza ukázala, že OCA blokuje nukleární translokaci NF- κ B p65 a p50 podjednotek v trofoblastu (giant cells) myší placenty v oblasti tzv. labyrintu. Tato studie poskytla důkaz o roli FXR receptoru jako důležitého regulačního prvku placentárního zánětu (Chen a kol., 2016).

V nedávné studii na myších postrádajících FXR (FXR null myši) bylo prokázáno, že aktivace FXR pomocí agonistických ligandů inhibuje expresi zánětlivých mediátorů v reakci na aktivaci NF- κ B a selektivně inhibuje NF- κ B-zprostředkovanou hepatickou zánětlivou odpověď. Naopak FXR null myši vykazovali silné jaterní zánětlivé onemocnění. Naopak aktivace NF-B inhibovala expresi cílových genů pro FXR, což opět naznačuje provázanost NF-B signalizace a regulace FXR cílových genů podobně jako je tomu v případě PXR. Aktivace a ligandy FXR proto mohou přispět k hepatoprotekci a potlačení hepatokarcinogeneze (Wang a kol., 2008).

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je:

- 1) shrnout z dostupné literatury poznatky o NF- κ B signalizaci při zánětlivém procesu
- 2) zpracovat a otestovat buněčnou linii THP-1 jako model aktivace nebo inhibice NF- κ B při výzkumu a vývoji terapeutického zásahu na bázi ligandů nukleárních receptorů do NF- κ B signalizace pro potlačení zánětlivých procesů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Reagencie a přístroje

Médium RPMI-1640	(Sigma-Aldrich)
DMEM médium	(GIBCO, ThermoLife Technologies)
Roztok L-glutaminu	(Sigma-Aldrich)
Inaktivované Fetální bovinní sérum	(Sigma-Aldrich)
Neesenciální aminokyseliny	(Sigma Aldrich)
trypsinu 0,25%/EDTA	(Sigma-Aldrich)
tumor nekrotizující faktor- α (TNF α)	(Sigma-Aldrich)
48 jamková plata (destičky)	(TPP)
Lipofectamine 3000	(Thermo Life Technologies)
<i>Forbol 12-myristát-13-acetát (angl. phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)</i>	(Sigma-Aldrich)
Opti-MEM	(GIBCO, Thermo Life Thechnologies)
Fyziologický roztok pufrovaný fosfátovým pufrem pH7,4 (PBS) – připravený z tablet od f. Sigma-Aldrich	
Dual Luciferase Reporter Gene Assay kit s roztokem luminolu a passive lysis pufrem	(Promega)
Sérologické pipetiy 2 ml, 5 ml a 10 mL	(NUNC)
Centrifuga –hettich Universal 320 R	
Laminární box- FlowFAST H	
Bürkerovaě komůrka	
CO2 inkubátor	(MCO18A, Sanyo)

Princip

Pro studium aktivace nebo inhibice signální kaskády NF- κ B se často využívá plazmidů transfekovaných do buněčných linií a tzv. metody reporter gene assay.

Pro mou diplomovou práci jsme využili plazmid - **pNF- κ B-Luc** od firmy Stratagene. (katalogové číslo #219077 NF- κ B cis-Reporting System). Tento plazmid obsahuje 5 kopií responzivní oblasti (TGGGGACTTTCCGC).

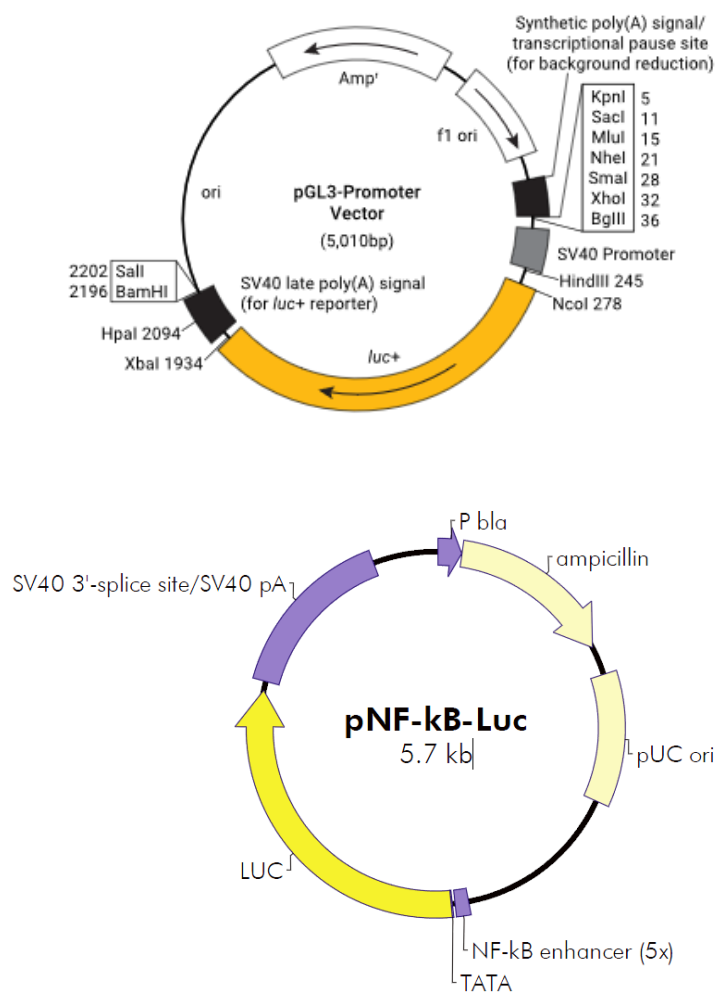
V plazmidu se nachází gen pro enzym luciferázu, který zprostředkovává bioluminiscenční reakce. Současně je v plazmidu místo, které je schopno vázat NF- κ B a spustit tak transkripci detekovatelné luciferázy. Dostane-li buňka signál, aktivuje se enzym I κ B kináza, která z transkripčního faktoru NF- κ B odstraní inhibitor I κ B- α . Aktivní NF- κ B pak vstupuje do jádra a váže se na vazebné místo plazmidu TGGGGACTTTCCGC a spustí transkripci genu pro luciferázu.

Čím více jsou testované látky aktivnější nebo experimentální podmínky více aktivují NF- κ B signalizaci, tím více dochází k expresi genu pro luciferázu, více dochází k bioluminiscenčním reakcím a tím více poté buňky vyzařují světlo, které se spektrofotometricky stanovuje. A naopak, inhibitory jsou schopné potlačit expresi luciferázy, která se před tím indukuje expozicí buněk LPS nebo TNF- α .

Pro optimalizaci transfekce jsem použil plazmid **pGL3-Promoter** od firmy Promega. Tento plazmid je expresní plazmid světluškové (Firefly) luciferázy s virovým promotorem SV40. Po vnesení plazmidu do buněk transfekcí dochází k intenzivní expresi luciferázy. Tento plazmid se používá na optimalizaci transfekce v buněčných liniích.

Zásobní roztoky plazmidů

- pNF- κ B-Luc (od f. Stratagene).
- pGL3-Promoter (od f. Promega)
- pSG5-hGR (od Dr. J. Palvimo, Finsko)
 - zásobní roztoky plazmidů byly připraveny ve firmě GenериBiotech



Obr. 15: Schéma použitých plazmidů PGL3-Promoter a pNF-kB-Luc.

Expresní vektor pGL3-Promoter silně exprimuje světluškovou (Firefly) luciferázu pomocí silného Simian Virus 40 (SV40) promotoru. Ve vektoru pNF-κB-Luc je transkripce a exprese světluškové luciferázy řízena NF-κB enhancerem, na který se váže aktivovaný transkripční faktor NF-κB. (Zdroj: webové stránky Thermo Life Science a Promega)

4.1 Buněčné linie

4.1.1 THP-1 – lidská monocytární leukemická linie

Lidská monocytární linie THP-1 byla získána z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (katalogové číslo 88081201).

Kultivace –pracovní postup:

Suspenzní buněčná linie THP-1 se kultivuje v 25 cm² kultivační ládvi.

Rozmrazit kryoprezervované THP-1 buňky uložené u kryoprezervačním zařízení s tekutým dusíkem a nasadit je do živného media (RPMI-1640 médiu + L-glutamin + 10% teplem inaktivované (angl. heat inactivated) fetální bovinní sérum s 1% roztokem neesenciální aminokyselin).

Buňky se kultivují v počáteční koncentraci 200 000 buněk/ml média.

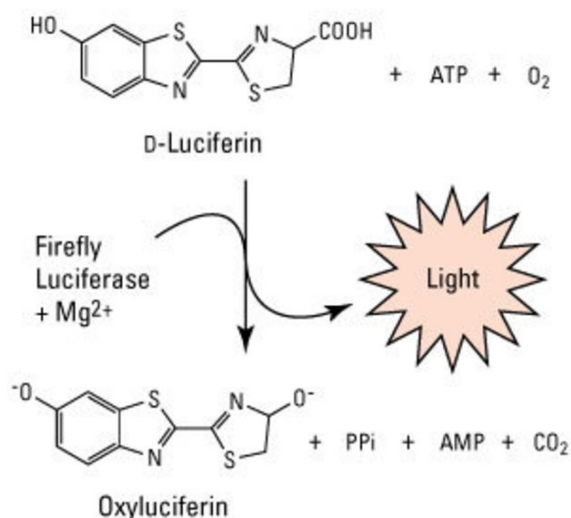
Pasážování se provádí následujícím postupem.

1. Obsah láhve se přepipetuje do 15 ml zkumavky (tzv. falkonky).
2. Zkumavka se centrifuguje na stolní centrifuze (1100 rpm na 4-5 minuty).
3. Do nové kultivační láhve se přidá 5 ml předehřátého média (37 °C).
4. Médium se odsaje a peleta buněk se opatrně resuspenduje 1 ml předehřátého média. Spočítá se koncentrace buněk ve 100 µl suspenze na Bürkerově komůrce.
5. Suspenze se přepipetuje sterilní sérologickou pipetou do nové láhve s předehřátým médiem.
6. Kultura se uloží do CO² temperovaného inkubátoru.

Ideální počet buněk je 3-5 x 100 000 buněk na 1ml média. Po několika pasážích, kdy jsou buňky v dobré kondici a s optimální viabilitou (nad 95%), se provádí experiment.

Transfekce monocytárních buněk v suspenzi:

1. Pro transfekci nediferencovaných buněk, 20 000 buněk v 1 ml nebo 50 000 buněk v 1 ml bylo nasazeno do jedné jamky 48-jamkového kultivačního plata.
2. Buňky byly inkubovány při 37°C v CO₂ inkubátoru 24 hodin.
3. Po 24 hodin od nasazení byla provedena transfekce. Před samotnou tranfekcí, je třeba připravit transfekční směs Lipofektaminu 3000 a DNA plazmidu pGL3-Promoter podle protokolu reagentu Lipofektamin 3000. Lipofektaminu 3000 (0,45 µl na jamku 48-jamkového plata) se rozpustí v 15 µl Opti-MEM medium. Plazmidová DNA se rovněž rozpustí v 15 µl Opti-MEM medium a přidá se 0,6 µl P300 Reagentu z kitu Lipofektaminu 3000. Množství DNA na 1 jamku bylo použito 100, 200 a 300 ng na jamku. Poté se oba roztoky spojí. 30 µl spojeného transfekčního média Opti-MEM se přidá na 1 jamku přímo do kultivačního média. Všechny kombinace byly provedeny v triplikátu (tj. ve třech jamkách).
4. Po 24 nebo 48 hodinách po přidání transfekční směsi do média se k buňkám přidal PMA v koncentraci 50 ng/ml na 24 hodin. Forbol způsobil, že buňky diferencovali a přisedly na dno kultivačního plata
5. Po 24 hodinách bylo odsáto médium buněk pomocí pasteurové pipety.
6. Bylo přidáno 40 µl lysis buffer do jamek a plato promícháno pro zajištění jednotného rozprostření, dále bylo plato zamraženo při -20°C (krystaly lyzují buňky).
7. Po rozmražení jsem inkuboval destičky 15 minut při pokojové teplotě.
8. 40 µl buněčného lyzátu vytemperovaného na pokojovou teplotu bylo smícháno s 50µl luciferase assay reagentu v bílé 96-jamkové destičce.
9. Analýza chemiluminiscence prostřednictvím destičkového spektrofotometru/luminometru Synergy 2 BioTek.
10. Vyhodnocení dat.



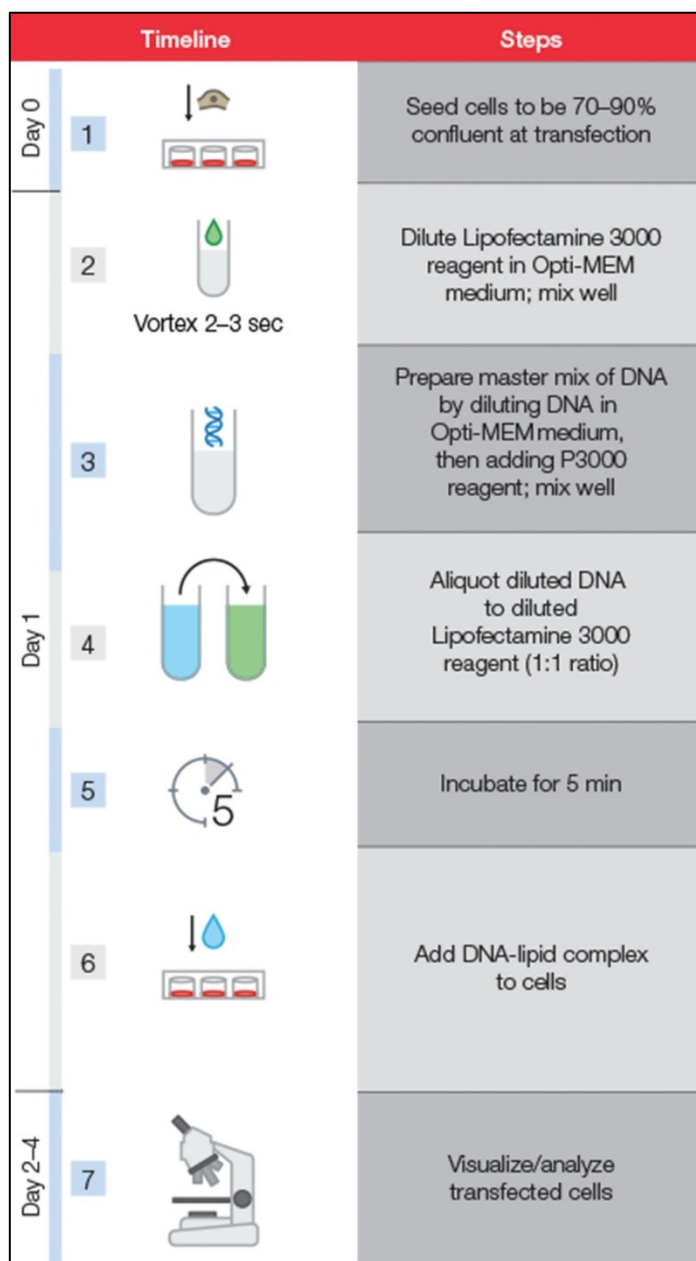
Obr. 16: Enzymatická reakce za pomoci světluškové luciferázy (*Luciferáza je enzym produkovaný čeledí hmyzu Lampyridae. Bioluminiscenci způsobuje luciferin, který se za přítomnosti luciferázy oxiduje na oxyluciferin za vzniku světla.*) Zdroj: ThermoFisher

Transfekce diferencovaných THP-1 buněk jako makrofágy:

Tyto experimenty byly provedeny podle stejného postupu s tím rozdílem, že PMA bylo přidáno k THP-1 buňkám před transfekčním reagentem. Tím pádem byly THP-1 buňky diferencovány kultivací s 50 ng/ml PMA před samotnou transfekcí.

1. THP-1 buňky byly nasazené na 48-jamkové plata v koncentracích 10 000 buněk na 1 ml, 20 000 buněk na 1 ml a 50 000 buněk na 1 ml kultivačního média.
2. Poté se na 24 nebo na 48 hodin přidal PMA (50 ng/ml).
3. Diferencované monocyty byly transfekovány po 24 anebo 48 hodinách diferenciaci v přítomnosti PMA.
4. Pro transfekci bylo použito množství plazmidové DNA vektoru pGL3-Promotor 100ng, 150ng, 200ng na jamku. Jako transfekční reagent byl použit Lipofectamine 3000 podle stejného postupu jako je uvedeno výše.
5. Po 24 hodinách po transfekci byly buňky omyty přehřátým PBS.
6. 40 μL lyzačního reagentu bylo přidáno k buňkám na každou jamku a buňky byly zamrazeny při -20°C. Po rozmrazení a vytemperování na pokojovou teplotu byly lyzáty (40 μL) přepipetovány na bílou 96-jamkovou destičku. Ke vzorkům byl přidán roztok luminolu (50 μl).

7. Vzorky byly analyzovány na přítomnost luciferázové aktivity na destičkovém spektrofotometru/luminometru Synergy 2 BioTEK.



Obr. 17: Schéma transfekce pomocí reagentu Lipofectaminu 3000.

Lipidový komplex s DNA se vytvoří smícháním roztoku DNA a Lipofectaminu 3000 v Opti-MEM médiu v poměru 1:1. Po 5 minutách inkubace se roztok přidá do kultivačního média. (Zdroj: web ThermoFisher Scientific).

4.1.2 HepG2

HepG2 je lidská buněčná linie odvozená od buněk hepatocytárního karcinomu. Byla získána z jaterní biopsie 15letého bělošského chlapce s diferencovaným hepatocelulárním karcinomem. Tato linie je často užívaný buněčný model hepatocytů. Linie HepG2 byla získána rovněž z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (katalogové číslo 8501143).

Kultivace –pracovní postup:

Buněčná linie HepG2 je adherentní buněčná linie, při pasážování proto musíme použít roztok trypsim/EDTA (0.25%) pro uvolnění buněk z kultivační láhve.

Buněčná linie HepG2 byla kultivována v 25 cm² kultivačních láhvích v médiu DMEM s přidáním 10 % fetálního bovinního séra (Sigma Aldrich) a 1% nesesenciálních amino kyselin.

Po dosažení stavu téměř úplné konfluence (>90%) se buňky pasážují. HepG2 buňky se pasážují každé 3-4 dny v poměru 1:5-8.

1. Při pasážování se odsaje médium pasterovou pipetou připojenou na vakuum.
2. Buňky se omyjí 3 ml předeřátého roztoku PBS –izotonického fosfátového pufru (pH 7,4).
3. Poté se k buňkám přidá 2 ml předeřátého roztoku trypsinu 0,25%/EDTA a buňky se umístí zpět do CO² inkubátoru.
4. Po uvolnění buněk se buňky resuspendují v 3 ml média sterilní plastovou pipetou a jedna pětina objemu suspenze se přenesse do 5 ml předeřátého média v nové kultivační láhvi.
5. Zbytek suspenze buněk se přenesse do 50 ml sterilní zkumavky (falkonky). Přidá se 10 ml předeřátého média sérologickou pipetou.
6. Změří se koncentrace buněk suspenze v Bürkerově komůrce.
7. Na 48jamkové plato se pipetuje 200 µl buněčné suspenze na jamku (50 000 buněk na jamku).

Transfekce adheroovaných buněk HepG2.

Po 24 hodinách kultivace HepG2 buněk (50 000 buněk na jamku) na 48jamkových destičkách buňky přisednou (adherují).

1. Odsajeme médium pastrovou pipetou spojenou s vakuem.
2. Přidáme 150 μ l čerstvého předeštěného média.
3. Připravíme si transfekční směs Lipofektaminu 3000 a plazmidu pNF- κ B-luc jako v případě THP-1 buněk. Konkrétně bylo použito 150 ng pNF- κ B plazmidu na jamku. Současně byl do transfekční směsi přidán expresní plazmid pro glukokortikoidní receptor (pSG5-hGR, 100 ng na jamku).
4. Transfekční směs přidáme k médiu.
5. Buňky umístíme do CO₂ inkubátoru na 24 hodin.
6. Po 24 hodinách přidáme TNF α (10 ng/ml) do tří jamek. K dalším třem jamkám přidáme dexametazon ve finální koncentraci 100 nmol/l. K posledním 3 jamkám přidáme TNF α (10 ng/ml) a současně dexametazonu (100 nmol/l). Média si předpřipravíme na 12-kultivačních platech.
7. Buňky inkubujeme dalších 24 hodin v temperovaném CO₂ inkubátoru.
8. Odsajeme médium pomocí Pasteurové pipety.
9. Přidáme 40 μ l lyzačního pufru na jamku. Kultivační destičku pak necháme zmrznout v mrazáku pro účinnou lýzu buněk. Poté plato vyjmeme z mrazáku.
10. Inkubujeme kultivační destičku při pokojové teplotě. Promícháme destičku v polovině inkubace.
11. Smícháme 40 μ l buněčného extraktu (lyzátu) vyváženého (vytemperovaného) na pokojovou teplotu s 40 μ l roztokem luminolu (luciferase assay reagentu) v 96-jamkové destičce.
12. Analyzujeme chemiluminiscenci na destičkovém spektrofotometru/luminometru Synergy 2 BioTek.
13. Vyhodnocení dat.

4.2 Výsledky

4.2.1 Optimalizace transfekce linie THP-1 za nediferencovaného a diferencovaného stavu

Při transfekci buněk THP-1 bez diferenciaci na makrofágy jsme nepozorovali žádnou luminiscenci v žádné testované koncentraci plazmidu ani v žádné koncentraci kultivovaných buněk THP-1.

Podobně v případě diferencovaných THP-1 buněk transfekovaných za různých podmínek plazmidem pGL3-Promoter jsme nepozorovali žádnou luminiscenci.

U buněk THP-1 diferencovaných 48 hodin jsme pozorovali zřetelné vezikuly kolem plazmatické membrány a jádra, celková morfolgie buněk však byla normální.

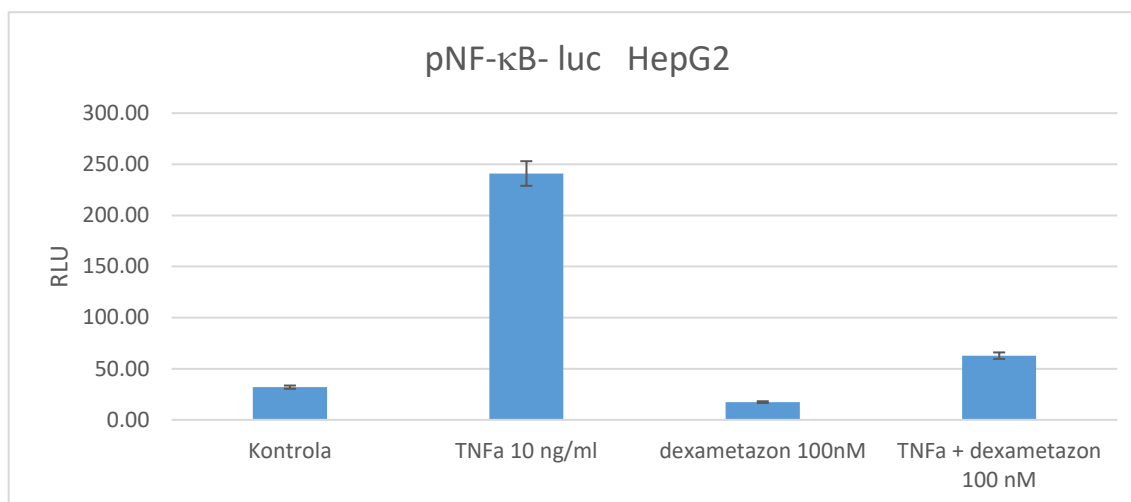
4.2.2 Ověření funkčnosti plazmidu pNF κ B-luc na linii HepG2

V experimentu s HepG2 buňkami jsme použili ověřený postup transfekce pomocí reagentu Lipofectamine 3000. Ověřovali jsme, zdali plazmid pNF- κ B-Luc je funkční a zdali glukokortikoid dexametazon inhibuje aktivaci NF- κ B za těchto podmínek.

Pro aktivaci NF- κ B jsme použili tumor nekrotizující faktor- α (TNF α) v koncentraci 10 ng/ml v kultivačním médiu.

Jak vidno, TNF α zvýšil přítomnost luciferázy v buňkách (Obr. 17). Dexametazon prokázal protizánětlivý účinek a snížil aktivaci plazmidu pNF- κ B-Luc v jamkách s TNF α .

Tyto výsledky potvrzují, že použitý plazmid byl v pořádku a že protokol experimentu byl zvolen správně.



Obr. 18: Ověření funkčnosti reportérového plazmidu pNF-κB-Luc na buněčné linii HepG2.

HepG2 linie byla transfekována reportérovým plazmidem pNF-κB-Luc (150 ng na jamku) a expresním vektorem pro glukokortikoidní receptor (pSG5-hGR, 100 ng na jamku). Po 24 hodinách bylo do média přidáno 10 ng/ml TNF α , dexametazon (100 nM) nebo jejich kombinace.

Po 24 hodinách inkubace byly buňky lyzovány a detekovány pro aktivitu luciferázy. Data jsou prezentována jako průměry měření ze třech jamek se směrodatnou odchylkou. Aktivita luciferázy je vyjádřena v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU).

Kontrola značí, že do média bylo přidáno samotné vehikulum, dimetylsulfoxid (DMSO), v množství 0,1% objemu. Stejně množství DMSO je i v ostatních vzorcích pro eliminaci případného účinku vehikula.

5 DISKUZE

THP-1 je jedna z nejužívanějších buněčných linií v experimentální biomedicině. Používá se především při studiu *in vitro* ovlivňování monocytů a funkce makrofágů, k podpoře eventuální *in vivo* prokázané farmakologické aktivity léků a nutrientů, studiu signalizačních kaskád nebo pomocí této linie můžeme naznačit možné reakce, které by se mohly vyskytnout *in vivo*. Jejich výhodou je, že se jedná o nádorové buňky. Ty mají schopnost se neustále množit, proliferovat. Monocyty THP-1 se navíc pomocí PMA přítomného v médiu diferencují v buňky, které se více přibližují k buňkám nenádorovým, více fyziologickým, na kterých se pak dá lépe studovat signalizace nebo fagocytóza normálních makrofágů.

V této diplomové práci jsem měl za cíl zavést transfekci THP-1 buněk pomocí reagentu Lipofectamine 3000 a využít tuto metodu pro vnesení reportérového plazmidu pNF- κ B-Luc do THP-1 buněk. To by umožnilo studovat aktivitu nebo i protizánětlivý účinek látek na tomto modelu sledováním aktivity NF- κ B transkripčního faktoru a jeho signalizace.

Bohužel se nepodařilo transfekovat modelový expresní vektor pGL3-Promoter do THP-1 buněk ani jedním ze zkoušených postupů, tj. transfekcí monocytárních buněk v suspenzi před diferenciací PMA nebo transfekcí přisedlých částečně diferencovaných buněk po přidání PMA. Rovněž vliv množství DNA použitého pro transfekci, vliv množství transfekovaných buněk ani délka diferenciací prostřednictvím PMA neměl vliv na zvýšení účinnosti transfekce.

V případě transfekce diferencovaných THP-1 buněk jsme pozorovali měchýřky (pravděpodobně fagozomy) podél buněčné membrány a jádra. Lze se proto domnívat, že diferencované buňky s fagocytickou schopností fagocytovaly komplexy DNA s plazmidovou DNA, avšak plazmidový vektor nebyl schopen se z těchto fagozómů uvolnit do cytoplasmy a spustit transkripci světluškové luciferázy.

V dalších experimentech je proto nutno zvážit jiné postupy vnesení vektoru pNF- κ B-Luc do THP-1 buněk. Především bude třeba zkusit elektroporační metody. Tato metoda se využívá v genovém inženýrství. Do květy, ve které je roztok s buňkami se přes elektrody zavede napětí o několika tisících voltech, které vytvoří pór v buněčné membráně. Tímto pórem je možné do buněk vnést plazmid. Kromě elektroporace, která patří společně s elektrofúzí mezi elektrické metody, existují i další umělé metody pro transfer DNA (plazmidu) do buněk. Fyzikální metody zahrnují například makroinjekci, mikroinjekci, hydrodynamickou injekční aplikaci DNA a tzv. biobalistiku (Gene gun metoda). Mezi

chemické metody se může zařadit např. lipofekce (lipozomální transfekce, využití fosforečnanu vápenatého, polymerních nanočástic, sonoporace nebo tzv. impalefekcí (nabodnutí buněk nanojehličkami nesoucí DNA). (zdroj: slideplayer, Direct Gene Transfer Methods)

K vůbec nejefektivnějším a nepoužívanějším metodám v klinickém i experimentálním výzkumu patří virové vektory. Viry jsou vhodným prostředkem pro dodání genů do buněk vzhledem k jejich vysoké transdukční účinnosti. Skýtají také ovšem řadu nevýhod jako je cytotoxicita, technicky náročnější zpracování, nároky na bezpečnostní zabezpečení laboratoře a variabilitu v transfekční účinnosti, vysoká cena z důvodu požadavků na biologickou bezpečnost. (zdroj: ThermoFisher.com)

V dalším experimentu jsme testovali, zdali plazmid pNF- κ B-Luc je vhodný jako prostředek pro sledování aktivity NF- κ B faktoru na buněčné úrovni. HepG2 buňky byly transfekovány tímto vektorem spolu s expresním vektorem pro glukokortikoidní receptor (pSG5-hGR). Důvodem užití tohoto vektoru je, že v HepG2 je malé množství endogenního glukokortikoidního receptoru. HepG2 byla vybrána, jelikož skupina Prof. Pávka má dobré zkušenosti s vysokou účinností transfekce této linie za použití Lipofektaminu 3000.

TNF α znatelně aktivoval aktivitu luciferázy v HepG2 linii. Naopak glukokortikoid dexametazon s protizánětlivým účinkem snížil syntézu luciferázy v přítomnosti TNF α (Obr. 17). Lze proto říci, že pNF- κ B-Luc plazmid je vhodný pro měření aktivity NF- κ B transkripčního faktoru v buňkách a případně pro testování protizánětlivého účinku látek. Jelikož je HepG2 buněčná linie odvozená o nádorů jater, nikoli od buněk imunitního systému, je dobrá funkčnost této metody v této linii překvapivá. Lze však předpokládat, že pokud bychom zavedli transfekci buněk THP-1, tedy buněk imunitního systému s předpokládanou vysokou aktivitou NF- κ B, účinek stimulace pomocí TNF α by byl řádově vyšší a celá metoda citlivější.

NF- κ B je klíčový faktor v zánětlivé odpovědi zodpovědný za progresi řady autoimunitních onemocnění např. revmatoidní artritida (RA), lupus erythematosus, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, zánětlivé onemocnění střev (Crohnova choroba). Z těchto je nejvíce nemocných trpící RA. Proto je také v komerčním zájmu vyvinout látky, které by inhibovaly NF- κ B aktivaci. Existuje i biologická léčba, která je ale drahá a musí se aplikovat injekčně. Je proto velká snaha o vytvoření malých molekul, jež by se daly zformulovat např. do tablet, tedy za účelem snížit NF- κ B aktivaci v synoviálních buňkách

a tím snížit produkci zánětlivých cytokinů. Neméně zajímavé je i opakované zavádění synoviálních kmenových buněk do postiženého místa (Simmonds a Foxwell, 2008).

Bohužel zatím nejsou na trhu léčiva, která by NF- κ B inhibovala. Tento výzkum však probíhá a zaměřuje se na inhibitory, které mohou blokovat signalizační kaskádu NF- κ B na více úrovních. Právě proto, že regulace probíhá na různých úrovních, může být vývoj nových léčiv zaměřen na inhibici úrovně, např. inhibitory IKK, proteasomu, jaderné translokace nebo zablokování vazby na DNA (Liu a kol., 2017).

Dalším velkým otazníkem je využití ligandů některých dalších nukleárních receptorů jako protizánětlivých léčiv. Publikace z nedávné doby (Dou a kol., 2013; Wallace a kol., 2010; Shah a kol., 2006; Wang a kol., 2008) ukazují, že například ligandy PXR receptoru by mohli tlumit aktivitu NF- κ B faktoru a mít tak protizánětlivé účinky.

Proto je třeba intenzivního výzkumu v této oblasti, abychom mohli na tuto otázku najít odpověď. Rovněž zde je zájem vytvořit nové citlivé metody pro testování nových látek, zdali inhibují NF- κ B, a mohou tak mít protizánětlivé účinky.

6 ZÁVĚR

Bohužel se nepodařilo účinně transferovat buňky THP-1 v použitých uspořádáních kultivace za použití reagentu Lipofectamine 3000. Z tohoto důvodu jsme nemohli zavést a optimalizovat metody detekce aktivity NF- κ B faktoru v buněčné linii THP-1.

Další experimenty by se měly zaměřit na jiné způsoby genetické modifikace THP-1 buněk pro zavedení této metody.

7 LITERATURA

- Baltimore David, Discovering NF- κ B, 2009
- Barnes PJ., Clin Sci (Lond). 1998 Jun;94(6):557-72., Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms.
- Beatriz Y. Hanaoka, Charlotte A. Peterson, Craig Horbinski & Leslie J. Crofford, Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies, Nature Reviews Rheumatology volume 8, pages 448–457 (2012)
- Bhattacharjee Saugat, Acharya Institute, Bangalore, Direct Gene Transfer Methods, 2013
- Creative-diagnostics.com/The-NF-kB-Signaling-Pathway.htm
- Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C (Jun 1995). "Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites". Cell. 81 (5): 687–93
- Gu Xinsheng et al., Role of NF- κ B in Regulation of PXR-mediated Gene Expression a mechanism for the suppression of cytochrome p-450 3A4 by proinflammatory agents, 2006
- Guodong Lia,b and Grace L. Guo, 2015, Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration
- Haisong Zhang and Shao-Cong Sun, Published online 2015 Nov 16. doi: 10.1186/s13578-015-0056-4, NF- κ B in inflammation and renal diseases
- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ, Immunopharmacol. 2014 Nov;23(1):37-45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002. Epub 2014 Aug 14. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach.
- Chao Zheng, Qian Yin and Hao Wu, Structural studies of NF- κ B signaling, 183–195. 2010 Dec 7
- Ital J Pediatr. 2013; 39: 29., 2013 May 10. doi: 10.1186/1824-7288-39-29, Modulation of airway epithelial cell functions by Pidotimod: NF- κ B cytoplasmatic expression and its nuclear translocation are associated with an increased TLR-2 expression
- Jiao Y, Lu Y, Li XY (Jan 2015). "Farnesoid X receptor: a master regulator of hepatic triglyceride and glucose homeostasis". Acta Pharmacologica Sinica. 36 (1): 44–50.
- Neil D. Perkins, Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 49–62 (2007)
- NF- κ B in inflammation and renal diseases, Haisong Zhang and Shao-Cong Sun, Cell & Bioscience 2015
- Osier Faith HA, Gaoqian Feng, Michelle J Boyle, Christine Langer, Jingling Zhou, Jack S Richards, Fiona J McCallum, Linda Reiling, Anthony Jaworowski, Robin F Anders,

Kevin Marsh and James G Beeson, BMC Medicine 2014, Opsonic phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria

- Pávek a kol., Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí, Remedia 2005
- S. Wissink E. C. van Heerde B. van der Burg P. T. van der Saag, A Dual Mechanism Mediates Repression of NF- κ B Activity by Glucocorticoids, Molecular Endocrinology, Volume 12, Issue 3, 1 March 1998, Pages 355–363
- Sallusto F, Lanzavecchia, Monocytes join the dendritic cell family. *A Cell.* 2010 Oct 29; 143(3):339-40.
- Shah Yatrik M., Xiaochao Ma, Keiichirou Morimura, Insook Kim, and Frank J. Gonzalez, Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF- κ B target gene expression, 2006
- Siebenlist et al. (2005) Nat. Rev. Immunol., modified (<http://www.gci3.ovgu.de/SFB854/en/Projects/A23N+I%D2%9BBNS.html>)
- Simmonds R. E. and B. M. Foxwell, Signalling, inflammation and arthritis: NF- κ B and its relevance to arthritis and inflammation, Rheumatology, Volume 47, Issue 5, 1 May 2008, Pages 584–590
- Tian B, Brasier AR (2003). "Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network". Recent Progress in Hormone Research. 58: 95–130.
- Timothy S. Blackwell , and John W. Christman, The Role of Nuclear Factor- κ B in Cytokine Gene Regulation, Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics Haitao Guo, Justin B Callaway & Jenny P-Y Ting, 2015
- Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun, NF- κ B signaling in inflammation, 2017
- Tolson Antonia H. and Hongbing Wang, Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, 2010
- Tompkins a Wallace, 2007, https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-PXR-activation-by-a-xenobiotic-leading-to-CYP3A4-induction_fig2_231222913
- Wallace K., David E. Cowie, Dimitrios K. Konstantinou, Stephen J. Hill, Torunn E. Tjelle , Andrew Axon, Matthew Koruth, Steven A. White, Harald Carlsen, Derek A. Mann, Matthew C. Wright, The PXR is a drug target for chronic inflammatory liver disease, 2010

- Wang Y-D, Wei-Dong Chen, Meihua Wang, Donna Yu, Barry M. Forman, and Wendong Huang, Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor κ B in Hepatic Inflammatory Response, *Hepatology*, 2008
- Wei Dou, et al., 2013, Chrysin Ameliorates Chemically Induced Colitis in the Mouse through Modulation of a PXR/NF- κ B Signaling Pathway,
- Yuan-Hua Chen, et al, 2016, Obeticholic Acid Protects against Lipopolysaccharide-Induced Fetal Death and Intrauterine Growth Restriction through Its Anti-Inflammatory Activity
- Zhou C., Michelle M. Tabb, Edward L. Nelson, Felix Grün, Suman Verma, Asal Sadatrafie, Min Lin, Shyamali Mallick, Barry M. Forman, Kenneth E. Thummel, and Bruce Blumberg, Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- κ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation, 2006