

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

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

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR DIPLOMOVÉ PRÁCE:** Bc. Lenka Kasmanová

**VEDOUcí DIPLOMOVÉ PRÁCE:** doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

**2009**

Velmi ráda bych poděkovala odborné konzultance kpt. RNDr. Zuzaně Kročové, Ph.D za vedení, konzultace a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Také chci poděkovat RNDr. Petře Špidlové, Ph.D za podnětné názory a laborantce paní Márii Šafářové za odbornou pomoc.

V neposlední řadě chci poděkovat všem členům mé rodiny, kteří mě v průběhu celého studia podporovali.

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka KASMANOVÁ**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
  
Název tématu: **Změny v expresi cytokinů a chemokinů B-buněk po infekci Francisella tularensis**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
  - a) obecný úvod o intracelulární bakterii *F. tularensis*
  - b) rešerše zaměřená na úlohu B buněk v časné imunitě
  - c) úloha B buněk v infekci způsobenou *F. tularensis*
  - d) biologická funkce proteinů kódovaných jednotlivými sledovanými geny
- 2) Praktická část:
  - a) Seznámit se a osvojit si základní postupy kultivace a pasážování bakterií *F. tularensis* a B-buněčné linie Ramos.
  - b) Seznámit se a osvojit si metodu RT-PCR a real time RT-PCR.
  - c) Stanovit optimální podmínky a standardizace RT-PCR pro expresi jednotlivých vybraných genů.
  - d) Detekovat expresi jednotlivých genů po infekci buněk ramos *F. tularensis* FSC200 a lipopolysachridem z *E. coli* a *F. tularensis*.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**podle pokynu vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.**  
FVZ UO Hradec Králové  
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona. A s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Hradci Králové dne 27. 4. 2009

Bc. Lenka Kasmanová

## Anotace

*Francisella tularensis*, původce tularémie, je fakultativně intracelulární gramnegativní bakterie, která je schopna infikovat fagocytující i nefagocytují buňky a následně se v nich pomnožit.

Na povrchu B buněk jsou exprimovány 2 receptory pro lipopolysacharid gramnegativních bakterií, a to TLR4 a RP105 (CD180), jejichž aktivací se spustí dvě nezávislé signální cesty. Zatímco TLR4 je exprimován na různých typech buněk imunitního systému, receptor RP105 je preferenčně exprimován na B buňkách. Stimulací TLR4 je aktivována signální cesta vedoucí přes MyD88, IRAK a TRAF6 k transkripčnímu faktoru NF- $\kappa$ B. Stimulací RPI05 se aktivuje buď signální cesta přes proteiny Lyn, CD19 a Vav vedoucí k JNK nebo signální cesta přes PI3K a Btk vedoucí k NF- $\kappa$ B.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit změny v expresi genů kódujících receptorové molekuly a molekuly cytokinů a chemokinů u B-buněčné linie po infekci *F. tularensis*. K detekci genové exprese bylo využito metody reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

Klíčová slova: *Francisella tularensis*, B buňky, lipopolysacharid, RT-PCR

## Annotation

*Francisella tularensis*, the causative agent of the tularemia disease, is a facultative intracellular Gram-negative bacterium which is able to infect phagocytotic as well as non-phagocytotic cells and multiply in them subsequently.

Two receptors for lipopolysaccharide of gram-negative bacteria, TLR4 and RP105 (CD180), are expressed at the surface of B-cells. When they are activated, two independent signaling pathways are launched.

While TLR4 is expressed on immune-system cells of various types, RP105 is preferentially expressed on mature B-cells. Stimulating TLR4 activates signaling pathways leading through MyD88, IRAK and TRAF6 to transcriptional factor NF- $\kappa$ B. Stimulating RPI05 activates either Lyn, CD19 and Vav proteins signaling pathway, leading to JNK, or signaling pathway over PI3K, leading to NF- $\kappa$ B.

The aim of this diploma thesis was to determine changes in expression of genes that encode receptor molecules and molecules of cytokines and chemokines of B-cell line, after *F. tularensis* infection. Method of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the detection of gene expression.

Keywords: *Francisella tularensis*, B Cells, Lipopolysaccharide, RT-PCR

## Seznam použitých zkratk

ADCC	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity)
AOAH	acyloxyacyl hydroláza
AP-1	Activator Protein 1
APC	antigen prezentující buňka (Antigen Presenting Cell)
BCR	receptor B lymfocytů pro antigen (B cell Receptor)
BLNK	B cell Linker Protein
BLP	bakteriální lipopeptid (Bacterial Lipopeptide)
Btk	Bruton' s Tyrosine Kinase
CD	diferenciační antigen (Cluster of Differentiation)
CFU	kolonie tvořící jednotky (Colony-forming Unit)
CLIP	peptid invariantního řetězce asociovaný s MHC II. třídy (Class II Associated Invariant Chain Peptide)
CpG	úseky bakteriální DNA bohaté na cytosin a guanin
DAG	diacylglycerol
DD	doména smrti (Death Domain)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová (Deoxyribonucleic Acid)
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FcεRI	vysokoafinitní receptor pro Fc fragment IgE
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)
FDC	folikulární dendritická buňka (Follikular Dendritic Cell)
FPI	tularemský ostrov patogenicity ( <i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor



GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor)
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	guanosintrifosfát
HLA	hlavní lidský antigen (Human Leukocyte Antigen)
hsp	protein tepelního šoku (Heat Shock Protein)
Ig	imunoglobulin
IgIC	Intracellular Growth Locus C
Ii	invariantní řetězec (Invariant Chain)
i.d.	intradermální podání
i.p.	intraperitoneální podání
i.v.	intravenózní podání
IFN	interferon
IKK-i	inducibilní IκB kináza (Inducible IκB kinase)
IL	interleukin
IL-1R	receptor pro IL-1
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (Inducible Nitric Oxide Synthase)
IP3	inositol trifosfát
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)
ITAM	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrozinu (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motif)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
LAMP	lyzozomální integrální membránový protein (Lysosomal Integral Membrane Protein)
LBP	protein vázající lipopolysacharid (LPS-binding protein)
LD50	střední letální dávka (Median Lethal Dose)
LPS	lipopolysacharid

LRR	na leucin bohatá opakující se doména (Leucin-rich Repeat Domain)
LVS	Live Vaccine Strain
LT- $\alpha$	lymfotoxin- $\alpha$
MIIC	MHC Class II Containing Endosome Compartment
MAL	MyD88 Adaptor-Like Protein
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (Mitogen-activated Protein Kinase)
MD-2	Myeloid Differentiation Factor-2
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MKK6	MAPK kináza 6 (MAPK kinase 6)
M-MLV	Moloneyho myší leukemický virus (Moloney Murine Leukemia Virus)
MOI	multiplicita infekce (Multiplicity of Infection)
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NFAT	nukleární faktor pro aktivované T lymfocyty (Nuclear factor of activated T-cells)
NF-KB	nukleární faktor kappa B (Nuclear Factor-kappa B)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NO	oxid dusný
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
O.D.	optická denzita
p38 MAPK	P38 Mitogen-activated Protein Kinase
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (Pathogen-associated Molecular Pattern)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate-buffered Saline)
PDGF	růstový faktor produkovaný destičkami (Platelet-derived Growth Factor)
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PIP2	fosfatidylinositol difosfát
PKR	proteinkináza R (Protein Kinase R)
PKC	proteinkináza C
PLC $\gamma$	fosfolipáza C (Phospholipase C)

PRR	receptor rozeznávající PAMP (Pattern-recognition Receptor)
RNA	kyselina ribonukleová (Ribonucleic Acid)
RNase <sup>-</sup> voda	voda prostá enzymů štěpících RNA (RNase Free Water)
RP105	Radioprotective Protein 105 kDa
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)
s.c.	subkutánní podání
Src	produkt onkogenu src
TAK1	kináza 1 aktivující TGF- $\beta$ (TGF- $\beta$ Activating Kinase 1)
Tbk-1	kináza 1 vážící TANK (TANK-binding Kinase 1)
TD	antigeny závislé na T lymfocytech (Thymus dependent)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor (Transforming Growth factor)
TH	pomocný T lymfocyt (Helper T-cell)
TI	antigeny nezávislé na T lymfocytech (Thymus Independent)
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- $\alpha$	faktor nekrotizující nádory $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )
TOLLIP	protein interagující sToll (Toll-interacting protein)
TRAF 6	faktor 6 asociovaný s receptorem pro TNF- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ Receptor Associated Factor 6)
TRAM	INF- $\beta$ Related Adaptor Molecule
TRIF	Toll/IL-1R Domain-containing Adaptor-inducing IFN- $\beta$
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

## Obsah

1	Úvod.....	14
2	Teoretická část.....	15
2.1	Bakterie a imunitní systém .....	15
2.1.1	Bakterie a člověk.....	15
2.1.2	Identifikace s patogenem asociovaných molekulových vzorů .....	15
2.1.2.1	Lipopolysacharid .....	16
2.1.3	Receptory pro molekulové vzory asociované s patogeny.....	18
2.1.3.1	Toll-like receptory.....	18
2.1.3.2	Signální cesty aktivované přes Toll-like receptory.....	19
2.2	B buňky a protilátková imunita .....	22
2.2.1	Úloha B buněk v obraně proti mikrobiálním patogenům.....	22
2.2.2	Úloha B buněk v časně fázi imunitní odpovědi.....	24
2.2.3	Zpracování a prezentace antigenu B buňkami .....	25
2.2.4	Imunitní odpověď závislá na protilátkách .....	27
2.2.4.1	Protilátková odpověď nezávislá na T lymfocytech.....	27
2.2.4.2	Protilátková odpověď závislá na T lymfocytech.....	28
2.3	Francisella tularensis.....	30
2.3.1	Patogen.....	30
2.3.2	Tularémie .....	31
2.4	Interakce <i>F. tularensis</i> s hostitelskými buňkami .....	33
2.4.1	Interakce <i>F. tularensis</i> s makrofágy.....	33
2.4.2	Interakce <i>F. tularensis</i> s B buňkami .....	34
2.4.2.1	Úloha B buněk během časně imunitní odpovědi k <i>F. tularensis</i> .....	34
2.4.2.2	Přímá interakce B buněk s <i>F. tularensis</i> .....	36
3	Experimentální část.....	37
3.1	Seznam použitého materiálu.....	37
3.1.1	Buněčné linie a bakterie .....	37
3.1.2	Primery pro RT-PCR .....	37
3.1.3	Média, roztoky a chemikálie .....	40
3.1.4	Přístroje a laboratorní pomůcky.....	41
3.1.5	Příprava roztoků .....	42
3.2	Pracovní postup .....	44

3.2.1	Příprava buněčné suspenze.....	44
3.2.1.1	Rozmrazování buněčných suspenzí.....	44
3.2.1.2	Zamrazování buněčných suspenzí.....	44
3.2.1.3	Kultivace a pasážování buněk.....	45
3.2.1.4	Určení koncentrace a životnosti buněk.....	45
3.2.1.5	Příprava buněčné suspenze linie Ramos pro infekci.....	46
3.2.2	Příprava bakteriální suspenze .....	46
3.2.2.1	Příprava bakteriální suspenze <i>F. tularensis</i> FSC200 .....	46
3.2.2.2	Příprava bakteriální suspenze zabitě <i>F. tularensis</i> FSC200.....	47
3.2.2.3	Výsev a odečet CFU .....	47
3.2.3	Detekce genové exprese metodou RT-PCR .....	48
3.2.3.1	Infekce a stimulace buněk Ramos.....	48
3.2.3.2	Izolace RNA .....	51
3.2.3.3	Stanovení koncentrace RNA .....	53
3.2.3.4	Syntéza cDNA.....	54
3.2.3.5	Amplifikace cDNA.....	55
3.2.3.6	Elektroforéza .....	56
4	Výsledky.....	57
4.1	Experiment č. 1 .....	57
4.2	Experiment č. 2 .....	66
4.3	Experiment č. 3 .....	68
4.4	Experiment č. 4 .....	80
4.5	Experiment č. 5 .....	95
5	Diskuze .....	102
6	Závěr .....	109
7	Použitá literatura .....	118

# 1 Úvod

Bakterie představují nejstarší a nejpočetnější část živé přírody. Je odhadováno, že mikroorganismy tvoří 60% biomasy na Zemi. Mikrobiální svět, který člověka obklopuje od narození do smrti, se vedle genetické dispozice významnou měrou podílí na utváření individuální imunologické reaktivity. Význam je v tomto ohledu přisuzován environmentálním mikroorganismům tvořících přirozenou mikroflóru sliznic člověka i patogenním mikroorganismům.

Pozitivní vliv mikrobiálního světa pro člověka dokládá přirozená mikroflóra, která osídluje vnější a vnitřní povrchy lidského těla. Přirozená mikroflóra sliznic a kůže soutěží o „životní prostor“ s patogenními mikroorganismy, zejména o povrchové receptory buněk a nutriční zdroje. Přirozená mikroflóra gastrointestinálního traktu se podílí na konečných fázích trávení potravy. Produkci bakteriocinů zabraňuje růstu a množení patogenních agens.

Přestože patogenní mikroorganismy představují pouze minoritní část mikrobiálního světa, jsou ve středu pozornosti lidí i medicíny. V 2. polovině minulého století nastala zásadní změna ve vztahu člověk a patogenní mikroorganismy v souvislosti s využitím principů aktivní imunizace a s širokou aplikací antibiotik. Přesto bakteriální infekce zůstávají jednou z hlavních příčin smrti člověka.

## **2 Teoretická část**

### **2.1 Bakterie a imunitní systém**

#### **2.1.1 Bakterie a člověk**

Lidský organismus se vyvíjí v neustálé interakci s potenciálně nebezpečnými infekčními organismy. Vztah bakterií a jejich hostitelů lze rozlišit na symbiotické, komenzální a patogenní. Symbióza je vzájemně výhodné soužití dvou různých organismů. Komenzální vztah je sdílení stejného prostoru dvěma živými organismy bez zjevného prospěchu nebo škody. Patogenní vztah znamená evidentní prospěch jednoho partnera na úkor partnera druhého. Výsledkem patogenního vztahu je poškození či smrt jednoho z partnerů.<sup>1, 2</sup>

#### **2.1.2 Identifikace s patogenem asociovaných molekulových vzorů**

Složky přirozené imunity jsou schopny identifikovat „nebezpečné vzory“ patogenních mikroorganismů tzv. PAMP. Navíc jsou schopny odlišovat molekulové vzory mikroorganismů, které jsou součástí přirozené mikroflóry od molekulových vzorů asociovaných s patogenními mikroorganismy.<sup>3</sup>

Patogenní bakterie jsou vybaveny řadou komponent, které působí jako PAMP a stimulují imunitní systém. Příkladem patogenního motivu je LPS, který je součástí zevní membrány gramnegativních bakterií. Je nejúčinnějším aktivátorem zánětové reakce organismu. Kyselina lipoteichoová a peptidoglykan jsou charakteristickým vzorem grampozitivních bakterií. Na povrchu mykobakterií se nacházejí typické lipopeptidy a lipoarabinomanan. Kvasinky a jiná fungální agens obsahují polysacharidy glukany a manany. Všechny bakterie mají DNA, která oproti eukaryotní DNA obsahuje nemetylované sekvence CpG (motiv hexamer purin-pyrimidin-C-G-pyrimidin-pyrimidin). Další významnou složkou PAMP jsou bakteriální oligopeptidy obsahující N-formylmethionin, který se nevyskytuje u eukaryot. Za PAMP je možné pokládat také tzv. stresové bílkoviny (hsp). Produkci stresových proteinů reaguje bakteriální buňka na nepříznivé životní podmínky.<sup>4, 5</sup>

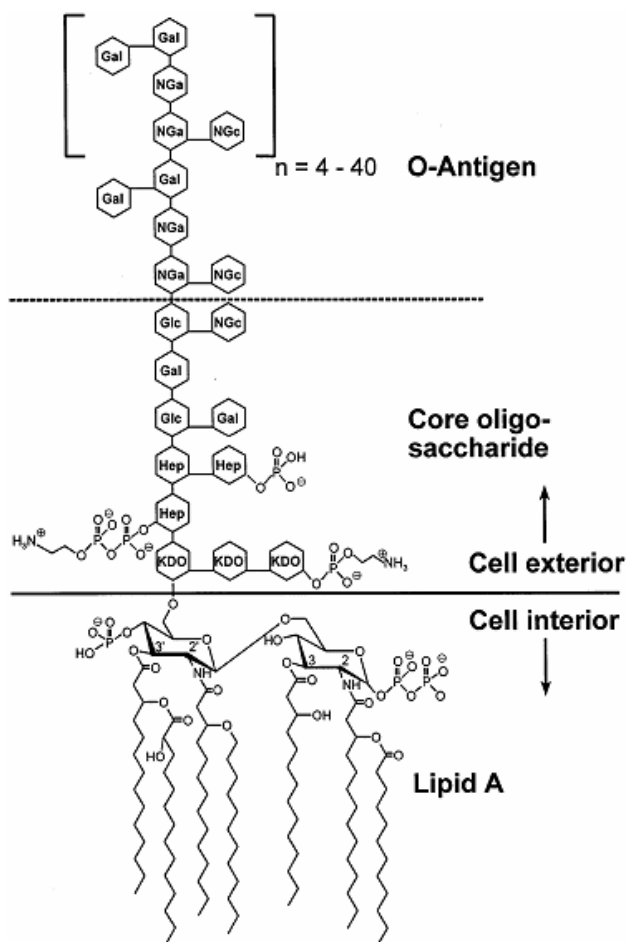
### 2.1.2.1 Lipopolysacharid

Lipopolysacharid je hlavní složkou zevní vrstvy vnější membrány gramnegativních bakterií. Interakce komplexu LPS a proteinu MD-2 s TLR4 makrofágů a buněk endotelu spouští signální kaskády vedoucí k uvolnění prozánětlivých cytokinů.<sup>6</sup> Je složen z amfifilních molekul o velikosti přibližně 10 kDa tvořících 3 základní části: lipid A, ovlivňující toxicitu LPS, základní polysacharid neboli R antigen a O polysacharid neboli somatický O antigen, určující imunologickou specifitu.<sup>78</sup>

Lipid A je společný pro všechny LPS gramnegativních bakterií. Je tvořený fosforylovaným N-acetylglukosaminovým dimerem s připojenými šesti až sedmi nasycenými mastnými kyselinami, které jsou vázány přímo na dimer nebo esterovou vazbou na 3-hydroxy mastnou kyselinu. Lipid A je toxický pro vnímavé živočišné buňky, je to tzv. endotoxin gramnegativních bakterií. Na N-acetylglukosamin je v poloze 6 navázán R polysacharid, který je společný pro příbuzné druhy bakterií. Skládá se z deseti a více lineárně i bočně vázaných, méně běžných monosacharidů, např. heptózy nebo 2-keto-3-deoxyoktanové kyseliny. 2-keto-3-deoxyoktanová kyselina je přítomna ve všech LPS a v jiných sloučeninách se nevyskytuje. Na základní polysacharid navazuje specifický polysacharid. Je velmi dlouhý a skládá se z lineárně zřetězených, opakujících se tetrasacharidových nebo pentasacharidových jednotek (dosahuje délky až 100 monosacharidových jednotek). Je lokalizován na vnější straně buněčné membrány a je nositelem antigenicity bakterie. Protože je mezi jednotlivými bakteriálními druhy i kmeny velká rozmanitost cukerných složek obsažených v O polysacharidu, je specifický polysacharid druhově i kmenově úzce specifickým antigenem.<sup>7, 9</sup>

*E. coli* LPS je strukturně velmi blízký optimální struktuře umožňující maximální aktivaci TLR4, proto je považován za nejúčinnější LPS pro aktivaci buněk imunitního systému.<sup>10</sup>



Obr. 1 Struktura LPS *E. coli*

Rozpoznání LPS buňkami imunitního systému vede k aktivaci signálních cest, uvolnění prozánětlivých mediátorů např. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  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.<sup>10</sup>

*F. tularensis* LPS má zvláštní strukturu. Na lipid A jsou navázány neobvykle dlouhé mastné kyseliny, chybí fosforylace a  $\alpha$ -glukosamin není v poloze 3 acylován. Ve struktuře se také objevují neobvyklé  $\beta$ -(1-6)glukany.<sup>11</sup> *F. tularensis* LPS není schopen aktivovat makrofágy k produkci TNF- $\alpha$  a NO a není schopen nespecificky aktivovat B buňky k proliferaci nebo sekreci imunoglobulinů a cytokinů, nebo se tak děje v koncentraci 100-1000x větší než u LPS ostatních gramnegativních bakterií. Příčinou je zřejmě jeho neobvyklá struktura.<sup>12, 13</sup>

### 2.1.3 Receptory pro molekulové vzory asociované s patogeny

Mikrobiální PAMP jsou identifikovány prostřednictvím membránově vázaných i solubilních molekul přirozené imunity. Souhrnně se označují jako receptory pro patogenní vzory (PPR). Zatímco na podnět představovaný patogenními mikroorganismy je třeba zareagovat obrannou reakcí, podnět poskytnutý molekulovými vzory nepatogenních mikrobů musí vést k navození stavu imunitní neodpovídavosti, protože každá imunitní odpověď v sobě zahrnuje potenciální riziko poškození.<sup>14</sup>

PPR jsou exprimované na povrchu buněk, které přicházejí jako první do kontaktu s vnějším prostředím, tzn. i s patogeny. Jsou to především epitelové buňky na povrchu sliznic a buňky přirozené imunity. Tyto buňky mají dva druhy receptorů, které se liší zprostředkovanou odpovědí na rozpoznání PAMP. Do první kategorie patří receptory, které zprostředkovávají fagocytózu, zejména receptory pro Fc-domény imunoglobulinů a pro C3b fragment komplementu. Do druhé kategorie patří receptory, které po rozpoznání PAMP aktivují zánětovou reakci. Jedná se o rodinu receptorů podobných Toll (TLR) a rodinu receptorů pro interleukin-1 (IL-1R).<sup>5, 15</sup>

Strukturně jsou PPR řazeny do několika rodin makromolekul. Mezi povrchové receptory patří např. CD14, manózoový nebo scavengerový receptor. Intracelulárními receptory jsou PKR a NOD. Solubilními složkami PRR jsou LBP, MBL nebo pentraxiny (CRP, SAP).<sup>5, 14, 16</sup>

#### 2.1.3.1 Toll-like receptory

Názvem Toll se označuje gen v genomu octomilky (*Drosophila melanogaster*), jehož produkty se účastní na jejím ontogenetickém vývoji a obraně proti různým houbovým infekcím. Analogie tohoto genu byla brzy objevena i u jiných živočichů, včetně savců a člověka, a dokonce i u vyšších rostlin. Jeho produkty jsou receptory podobné Toll a označují se TLR.<sup>14, 17</sup>

TLR patří do rodiny transmembránových receptorů typu I, pro které je charakteristická extracelulární, na leucin bohatá doména LRR, na kterou se váže přímo lipopolysacharid, lipoteichoová kyselina, peptidoglykan a jiné lipoproteiny, 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.<sup>14</sup>

V současnosti je popsáno u člověka 10 receptorů TLR (TLR1-TLR10), které mají různé funkce v rámci nespecifické imunity. TLR, které se odlišují ve své extracelulární části, váží odlišné ligandy, většinou se jedná o PAMP, mají však shodnou cytoplazmatickou část. Asociace ligandů s extracelulární doménou TLR vede ke konformační změně v cytoplazmatické části receptoru.<sup>17</sup>

Za nejvýznamnější jsou považovány TLR2, TLR4 a TLR9. Receptor **TLR2** rozpoznává velké množství mikrobiálních produktů, např. peptidoglykan a kyselinu lipoteichoovou grampozitivních bakterií, lipopeptidy, lipoarabinomanan mykobakterií a další. S **TLR1** a **TLR6** je schopen vytvářet heteromerní struktury, každá z nich je určena k rozpoznávání rozdílných ligandů. Receptor **TLR4** byl popsán jako první savčí TLR a je využíván hlavně buňkami imunitního systému. Jeho hlavním ligandem je LPS gramnegativních bakterií, ale váže i lipoteichoovou kyselinu 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.<sup>18</sup> Receptor **TLR9**, slouží jako receptor pro sekvence CpG bakteriální DNA. **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**.<sup>15, 19</sup>

### 2.1.3.2 Signální cesty aktivované přes Toll-like receptory

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- $\kappa$ B a IRF-3.<sup>14, 20</sup>

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- $\kappa$ B a expresi genů např. pro TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-8, dále pak TRIF/TICAM-1 a TRAM/TICAM-2 zprostředkovávající signalizaci vedoucí k transkripčnímu faktoru IRF-3 a expresi genů např. pro IFN- $\beta$ , IP-10, Rantes, iNOS signální cestou nezávislou na MyD88.<sup>19, 20</sup>

Důležitými složkami **MyD88-dependentní** signální cesty jsou adaptorové proteiny MyD88, TOLLIP a TRAF6 a kináza IRAK. MyD88 obsahuje dvě interaktivní domény: TIR doména se na C-konci váže na TIR doménu TLR nebo IL-1R, na N-konci se váže na doménu kinázy IRAK.<sup>14</sup>

Kináza IRAK byla původně identifikována jako serin/treonin kináza asociovaná s IL-1R, která také obsahuje TIR doménu. Dosud byly identifikovány 4 členové rodiny IRAK: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M a IRAK-4. Proteiny IRAK se skládají z N-terminální domény tzv. DD domény, která je zodpovědná za interakci s Myd88, a centrální kinázové domény. IRAK je fosforylována a váže se na TRAF6, který přes TAK1 aktivuje NF- $\kappa$ B a přes MKK6 potom JNK a p38 MAP kinázu. TRAF6 se skládá z dvou C-terminálních domén (TRAF-N a TRAF-C), které jsou zodpovědné za interakci TRAF proteinu a ostatních signálních molekul.<sup>15, 17</sup>

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- $\kappa$ 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. TOLLIP má schopnost utlumit aktivitu IRAK a takto zabránit aktivaci NF- $\kappa$ 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.<sup>15</sup>

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- $\kappa$ 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 INF- $\beta$  může být zprostředkována také přes TLR3 vlivem virové infekce nebo dvouřetězcové RNA. Adaptorovým proteinem této signální cesty je pouze TRIF/TICAM-1.<sup>15, 21</sup>

Za nejdůležitější transkripční faktory zahrnuté ve zprostředkovaných signálních cestách TLR jsou považovány NF- $\kappa$ B a IRF-3, jejichž aktivace vede k expresi mnoha genů včetně genů pro cytokiny a chemokiny.<sup>21</sup>

## 2.2 B buňky a protilátková imunita

### 2.2.1 Úloha B buněk v obraně proti mikrobiálním patogenům

Na základě své elektroforetické pohyblivosti jsou protilátky (imunoglobuliny) řazeny do  $\gamma$ -frakce krevních bílkovin. Protilátky jsou solubilní formou antigenně specifického receptoru B buněk (BCR). Mají naprosto stejnou specifitu jako membránové BCR na B lymfocytech, které se diferencovaly do plazmatických buněk, tj. terminálního stádia diferenciaci B lymfocytů.<sup>22</sup>

Protilátky nemají výkonné funkce, jejichž prostřednictvím by mohly bezprostředně usmrtit patogenní mikroorganismy, které vnikly do těla. Antimikrobiální obrany se účastní nepřímo prostřednictvím některého ze tří mechanismů, a to neutralizace, opsonizace nebo aktivace komplementu.<sup>23</sup>

Protilátky mohou blokovat (neutralizovat) aktivitu toxinů uvolňovaných z mikroorganismů, nebo vazbou na kritické mikrobiální antigeny mohou bránit adhezii na buňky hostitele, a tím i pronikání patogenních mikroorganismů do buněk. Protilátka specifická proti antigenu na povrchu mikroorganismu reaguje s jeho determinanty. Mikroorganismus se tak obalí (opsonizuje) molekulami protilátky a v této formě je mnohem účinněji pohlcován profesionálními fagocyty nebo usmrcován NK buňkami mechanismem ADCC. Vazbou protilátky s antigenem vznikají imunokomplexy, které jsou účinnými aktivátory klasické cesty aktivace komplementu. Při aktivaci komplementu vznikají další opsoniny (fragment C3b) a chemotaktické faktory (fragment C5a), které dále přispívají k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a rozvoji zánětlivé reakce.<sup>24, 25</sup>

V průběhu odpovědi na mikrobiální podnět jsou nejprve produkovány specifické protilátky třídy IgM. Jejich produkce nevyžaduje izotypové přepnutí a jsou tvořeny plazmatickými buňkami, ve kterých se ještě neuskutečnila somatická hypermutace. Důsledkem je nízká afinita časných protilátek třídy IgM, která je však kompenzována jejich pentamerní strukturou, zajišťující relativně vysokou celkovou aviditu protilátek. Kvůli pentamerní struktuře nemohou protilátky pronikat do tkání, nacházejí se tedy především v krvi a v menší míře v lymfě. Díky pentamerní struktuře jsou protilátky třídy IgM nejsilnějšími aktivátory klasické dráhy aktivace komplementu. Neváží se však na Fc-receptory fagocytů. V pozdější fázi imunitní odpovědi prodělává část B

buněk somatické hypermutace a mohou vytvářet pozdní protilátky třídy IgM, které mají vyšší afinitu k danému antigenu.<sup>26</sup>

Protilátky dalších tříd, tj. IgG, IgA a IgE, jsou oproti protilátkám třídy IgM podstatně menší a mohou tedy pronikat z krve do tkání. Protilátky třídy IgG a IgE mají monomerní strukturami, část protilátek třídy IgA, vyskytující se na slizničním povrchu, je tvořena dimery tzv. sekrečních IgA protilátek. Schopnost monomerních protilátek účinně reagovat s antigenem je podmíněna jejich afinitou a proto většina B buněk tvořících tyto třídy protilátek prodělává po antigenní stimulaci somatické mutace. Selektovány jsou pak takové B lymfocyty, které tvoří protilátky s vyšší afinitou k danému antigenu.<sup>27</sup>

Protilátky třídy IgG jsou základní skupinou imunoglobulinů. Nacházející se v krvi a v tělních tekutinách a na rozdíl od ostatních tříd imunoglobulinů mohou pasivně prostupovat placentou. Účinně opsonizují patogenní mikroorganismy a zesilují tak jejich fagocytózu. Jsou schopny aktivace komplementového systému a vázat se na receptory pro Fc fragment. Mají tedy prozáněťové působení. Naproti tomu, protilátky třídy IgA jsou velmi málo účinné jako opsonizující látky a nejsou schopny aktivovat komplementový systém. Nemají tedy prozáněťové vlastnosti. To je na sliznicích velmi důležité, protože většina mikrobiálních podnětů působících na epitelové povrchy je zprostředkována mikroorganismy, které tvoří fyziologickou mikroflóru člověka.<sup>28</sup>

Protilátky třídy IgG a IgA jsou s vysokou afinitou schopny reagovat s toxiny a tím je neutralizovat. Sekreční protilátky třídy IgA neutralizují toxiny přímo na povrchu sliznic. Protilátky třídy IgG a IgA zasahují protektivně i do průběhu virových infekcí tím, že blokují povrchové virové struktury, kterými se virus váže na buněčné receptory. Podobně brání adhezenci patogenních bakterií na povrchy hostitelských buněk. Tvorba protilátek třídy IgG je tedy nezbytná pro optimální imunitní odpověď prakticky vůči všem patogenním infekčním agens.<sup>28</sup>

Protilátky třídy IgE jsou schopny se vázat na receptory pro Fc fragmenty IgE, které jsou vyjádřeny na žírných buňkách. V cytoplazmě žírných buněk se nachází velké množství granul, které obsahují řadu biologicky aktivních látek (hydrolytické enzymy, histamin, serotonin, heparin, chondroitinsulfát). Po interakci antigenů s protilátkami třídy IgE navázanými na FcεRI dojde

k degranulaci žírných buněk a extracelulárnímu uvolnění obsahu cytoplazmatických granulí. Z fyziologického hlediska je výsledkem působení protilátek IgE ve velmi krátké době aktivace lokální obranné bariéry. Zásadní měrou se uplatňují i v imunitě proti parazitárním agens.

### 2.2.2 Úloha B buněk v časně fázi imunitní odpovědi

Populaci B lymfocytů lze rozlišit na dvě subpopulace, které se označují jako B1 a B2. Mezi subpopulacemi jsou jak strukturní, tak funkční rozdíly. Subpopulace B2 představuje asi 60-90% všech B buněk v periferní krvi dospělého člověka a tvoří naprostou většinu B lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech. Typickým buněčným znakem této populace je molekula CD19. Subpopulace B1 zaujímá asi 10-30% všech B buněk periferní krve dospělého člověka. V časných fázích postnatálního vývoje je však podíl B1 fyziologicky výrazně vyšší. Ve zvýšené míře se nacházejí i v určitých částech těla, např. abdominální dutině. Subpopulaci B1 lymfocytů dále dělíme na základě exprese molekuly CD5 na subset B1a nesoucí konstitutivně molekulu CD5 a subset B1b, který exprimuje CD5 až po aktivaci.<sup>29, 30</sup>

Charakteristickým znakem B1 buněk je tedy povrchová molekula CD5, jejíž exprese byla původně přisuzována pouze T lymfocytům a byla nazývána Ly-1. Dalšími membránovými znaky jsou integrinový heterodimer CD11b/CD18 a CD43. B1 lymfocyty exprimují ve velkém množství povrchové membránové IgM. Naopak v malé množství nesou povrchové membránové imunoglobuliny IgD a receptory B220 (CD45). Málo nebo vůbec neexprimují nízkofinitní receptor pro Fc fragment IgE CD23. Přirozeným ligandem pro molekulu CD5 je molekula CD72.<sup>29, 31</sup>

B1 lymfocyty tvoří imunoglobuliny převážně spontánně a výrazně převládají protilátky třídy IgM nad protilátkami třídy IgG. U B2 lymfocytů je tomu opačně. Protilátková aktivita B1 buněk vede k tvorbě tzv. přirozených protilátek. Přirozené protilátky tvoří první obranou linii proti infekčním patogenům. Jsou vysoce polyreaktivní a mohou se s nízkou afinitou vázat na cizorodé i vlastní struktury. Přirozené protilátky mohou reagovat s patogenním antigenem přímo neutralizací nebo nepřímo aktivací komplementového systému.<sup>25</sup>



V B1 lymfocytech neprobíhá somatická hypermutace a nemají schopnost přeměny na paměťové buňky. Naproti tomu v konvenčních B2 buňkách je frekvence somatických hypermutací velmi vysoká a je pro ně charakteristická tvorba paměťových buněk.<sup>25, 29</sup>

### 2.2.3 Zpracování a prezentace antigenu B buňkami

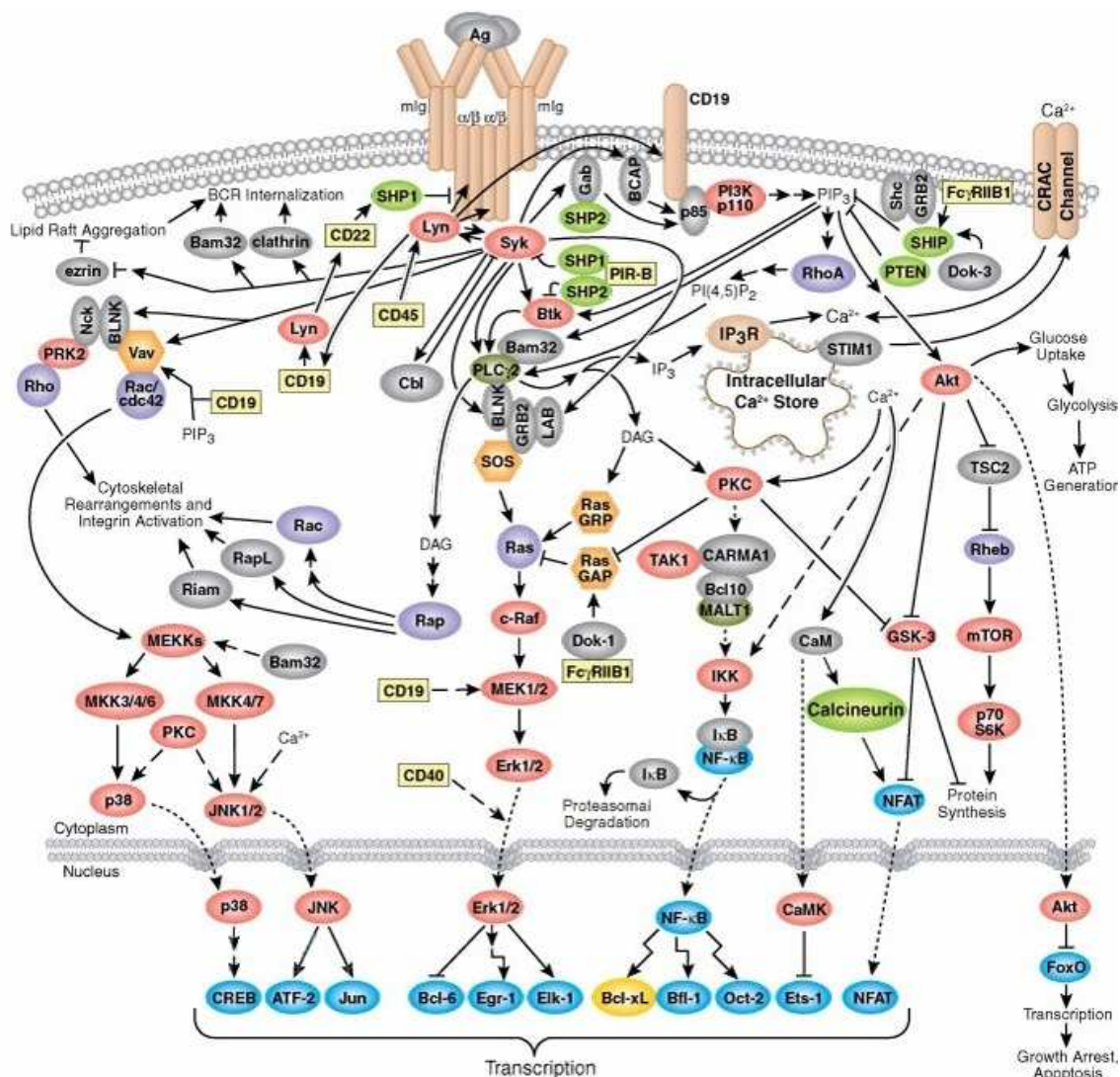
Schopnost zpracovat antigen, navázat ho na molekuly HLA II. třídy a prezentovat antigenní fragmenty  $T_H$  lymfocytům mají dendritické buňky, makrofágy a B buňky. B buňky oproti ostatním profesionálním fagocytům využívají k internalizaci antigenů povrchové imunoglobuliny, tj. antigenně specifické receptory B buněk. Následné štěpení internalizovaných antigenů probíhá v endosomu a lysosomu při nízkém pH.<sup>22, 32</sup>

MHC II. třídy se skládají ze dvou nekovalentně asociovaných transmembránových jednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Krátce po syntéze v endoplazmatickém retikulu, se molekula MHC II. třídy spojí s transmembránovým proteinem Ii. Ten má zabránit předčasné asociaci molekul MHC II. třídy s endogenními peptidy. Komplex HLA II. třídy a Ii jsou přes Golgiho aparát transportovány do MHC. Ii je v prostředí nízkého pH postupně štěpen proteolytickými enzymy, např. cathepsinem S. Nakonec zůstává na molekule HLA II. třídy navázán peptidový fragment, označený jako CLIP. Ten je z vazebného místa odstraněn chaperonem H2-DM a do volného vazebného místa na molekule HLA II. třídy se mohou vázat peptidové fragmenty vzniklé proteolýzou internalizovaného antigenu. Komplex HLA II. třídy a antigen jsou poté transportovány na povrch B buňky. Prezentované antigeny v komplexu s HLA II. třídy stimulují  $CD4^+$   $T_H$  lymfocyty.<sup>33, 34</sup>

Zpracování a prezentace antigenu B buňkami je tedy iniciována vazbou antigenu na BCR. BCR slouží nejen k vazbě a transportu antigenu do endozomálních kompartmentů, ale také k iniciaci signálních drah. Komplex BCR se skládá z vlastního povrchového imunoglobulinu a asociovaných signalizačních proteinů  $Ig\alpha$  (CD79 $\alpha$ ),  $Ig\beta$  (CD79 $\beta$ ) a CD19. Dimer  $Ig\alpha$ - $Ig\beta$  má ve své cytoplazmatické části aktivační motivy ITAM a je nekovalentně spojen s protein tyrozin-kinázami skupiny Src (Blk, Fyn a Lyn). Po rozpoznání antigenu prostřednictvím BCR dochází ke konformačním změnám na řetězcích  $Ig\alpha$  a  $Ig\beta$ .

Jejich prostřednictvím dochází k aktivaci kináz Src. Kináza Syk se váže na motivy ITAM a po své aktivaci fosforyluje cytoplazmatickou část molekuly CD19. Přenáší společně s kinázami Src aktivační signál na adapterovou molekulu BLNK. Poté dochází k aktivaci kináz Tec, které dále aktivují PLC $\gamma$ . PLC $\gamma$  štěpí membránově vázaný PIP $_2$  na IP $_3$  a DAG. Molekula IP $_3$  pomocí svých receptorů umístěných na endoplazmatickém retikulu mobilizuje ionty Ca $^{2+}$  a aktivuje serinovou fosfatázu kalcineurin. Komplex kalcineurinu, kalmodulinu a GSK-3 defosforyluje transkripční faktor NFAT. Molekula DAG aktivuje v přítomnosti iontů Ca $^{2+}$  PKC, jejichž prostřednictvím dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF $\kappa$ B. BLNK aktivují molekuly GEF, které následně aktivují GTP vázající proteiny, molekuly Ras. Působením Ras dochází k aktivaci MAPK, které aktivují transkripční faktor AP-1, jenž se skládá z heterodimeru Fos a Jun.<sup>33, 35, 36</sup>

Důsledkem všech uvedených aktivačních procesů je aktivace a translokace transkripčních faktorů do jádra, kde regulují přepis významných genů, např. pro tvorbu cytokinů a dalších proteinů.<sup>33</sup>



Obr. 2 Zpracování a prezentace antigenu B buňkami (Cell Signaling)

## 2.2.4 Imunitní odpověď závislá na protilátkách

Protilátková odpověď na většinu antigenů vyžaduje spolupráci  $T_H$  lymfocytů s B buňkami (tzv. TD antigeny). Některé antigeny vyvolávají diferenciaci B buněk na plazmatické buňky a sekreci protilátek i bez spolupráce T lymfocytů (tzv. TI antigeny).

### 2.2.4.1 Protilátková odpověď nezávislá na T lymfocytech

Na thymu nezávislé antigeny lze rozdělit do dvou podskupin podle toho, jakým způsobem aktivují B buňky. První skupina antigenů, označovaná jako TI-1, indukuje přímo proliferaci a diferenciaci B lymfocytů. Působí tedy jako

polyklonální mitogeny a způsobují nespecifickou stimulaci velkého množství B lymfocytů a produkci protilátek nezávisle na jejich antigenní specifitě. Antigeny TI-1 jsou schopny aktivovat nezralé i zralé B buňky. Příkladem antigenu TI-1 je např. LPS.<sup>37</sup>

Druhou skupinu na thymu nezávislých antigenů, označovaných jako TI-2, tvoří polymery složené z mnohokrát opakovaných základních jednotek, jako např. mikrobiální povrchové polysacharidy (obsažené typicky v obalu opouzdřených bakterií) nebo polymerní proteiny (např. flagellin). Tyto polymerní antigeny reagují simultánně s velkým počtem BCR a intenzivně je tím shlukují. Tím vznikají signály, které jsou dostatečně silné k tomu, aby vyvolaly buněčné dělení a diferenciaci na plazmatické buňky bez přímé pomoci T lymfocytů. Antigeny TI-2 stimulují k produkci protilátek především subset B1 lymfocytů, proto při tomto druhu protilátkové reakce dochází hlavně k tvorbě nízkoafinitních protilátek třídy IgM. Na rozdíl od antigenů TI-1 stimulují tyto antigeny pouze zralé B lymfocyty.<sup>38</sup>

Nezávislost na T lymfocytech není však úplná. B buňky stimulované TI-2 antigeny sice nepotřebují přímý kontakt s  $T_H$  lymfocyty, ale vyžadují některé cytokiny (IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ ), které jsou produkovány buď T lymfocyty nebo jiným typem buněk.

#### **2.2.4.2 Protilátková odpověď závislá na T lymfocytech**

Charakteristickým znakem protilátkových reakcí závislých na T lymfocytech je vznik paměťových buněk a vznik vysokoafinitních protilátek v procesu tzv. afinitní maturace. Tato protilátková odpověď probíhá ve dvou fázích zvaných primární a sekundární odpověď.<sup>38</sup>

##### Primární fáze protilátkové reakce

Zralé B buňky, které se ještě nesetkaly s antigenem se nazývají naivní B lymfocyty. Při prvním setkání s antigenním podnětem obvykle téměř současně probíhají dva děje. Vazbou antigenu na membránový BCR dochází ke stimulaci B buňky a dochází k pohlcení antigenu profesionální buňkou prezentující antigen, které je spojené s prezentací peptidových fragmentů v komplexu s MHC II. třídy prekurzorům  $T_H$  lymfocytů. Vzniklé  $T_H2$  lymfocyty pak

rozeznávají antigenem stimulované B buňky a poskytují jim signály, které způsobí jejich pomnožení, diferenciaci na plazmatické buňky a tím sekreci protilátek. Část B buněk se však nepřemění na plazmatické buňky, ale stanou se z nich paměťové buňky. Během této prvotní fáze protilátkové odpovědi jsou produkovány téměř výhradně protilátky třídy IgM. Mají nízkou afinitu k antigenu a jsou účinné při blokování šíření infekce. Tyto protilátky tvoří s antigeny imunokomplexy, které jsou zachycovány na povrchu FDC v primárních lymfoidních folikulech. Antigeny ve formě imunokomplexů pak mohou být dále rozeznávány B buňkami. FDC jsou tedy buňky prezentující antigen B lymfocytům.<sup>39</sup>

### Sekundární fáze protilátkové reakce

Po rozeznání antigenu na FDC v primárních lymfoidních folikulech a po získání pomocných signálů od specifických T<sub>H</sub> lymfocytů, začíná opět dělení a diferenciaci B buněk. Během této sekundární fáze protilátkové odpovědi dochází k izotypovému přesmyku a afinitní maturaci vznikajících protilátek. Místo protilátek třídy IgM se začnou tvořit jiné izotypy s vyšší výslednou afinitou. Pro zahájení izotypového přesmyku a vzniku paměťových buněk je nezbytná interakce B buněk s T<sub>H</sub>2 lymfocyty zprostředkovaná receptorem CD40 na povrchu B buněk a jeho ligandem CD40L (CD154) T<sub>H</sub> buněk. Membránová interakce je dále doplněna působením cytokinů. IL-4 se podílí na tvorbě protilátek podtřídy IgG1, IgG3 a IgE, TGF- $\beta$  a IL-10 indukuje vznik IgA, IFN- $\gamma$  indukuje tvorbu IgG2 a IgG3.<sup>39, 40</sup>

## 2.3 Francisella tularensis

### 2.3.1 Patogen

*F. tularensis* je fakultativně intracelulární, gramnegativní, aerobní, nepohyblivá, nesporulující tyčkovitá bakterie. Roste na standardní krevní živné půdě, ale neroste (nebo roste nespolehlivě) na většině dalších standardních agarových mediích. Vyžaduje pro růst cystein nebo cystin (ačkoli byly identifikovány atypické kmeny, které postrádají tento požadavek).<sup>41</sup>

*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 *F. philomiragia* je halofilní, zřídka asociován s lidským onemocněním a těžko identifikován běžnými metodami. Druh *Francisella tularensis* je dle biochemických a molekulárních testů členěn do 4 poddruhů: *tularensis* (někdy také označován jako *F. tularensis* typu A), *holarctica* (*F. tularensis* typu B), *novicida* a *mediasiatica*.<sup>6</sup>

*F. tularensis* subspecies *tularensis* je vysoce infekční, obvykle virulentnější a geneticky rozmanitější než subspecies *holarctica* a byla nalezena v Severní Americe. Projevuje se citrullin ureidasovou aktivitou a produkuje fermentací kyselinu z glycerolu. Geografické rozšíření subpopulací v lidských případech koreluje s rozšířením antropodických vektorů a králičích hostitelů. Subpopulace 1 (A.I, typ A-východní) se vyskytuje zejména ve středních Spojených státech amerických, je asociována s rozšířením klíštěte *Amblyomma americanum* a *Dermacentor variabilis* a má vysokou úmrtnost. Subpopulace 2 (A.II, typA-západní) se vyskytuje zejména na západě Spojených států amerických, je asociována s rozšířením klíštěte *Dermacentor andersoni* a *Chrysops discalis* a má nízkou úmrtnost.<sup>6, 41, 42</sup>

*F. tularensis* subspecies *holarctica* (typ B, dříve označovaná jako *palaeartica* nebo v některých zdrojích *paleartica*) je méně virulentní než subspecies *tularensis*, nedemonstruje se citrullin ureidasovou aktivitou a neprodukuje fermentací kyselinu z glycerolu. Jsou identifikovány 3 biovary: Biovar I je erytromycin citlivý, nachází se zejména v severní Americe, Evropě, Sibiři, Dálném východu a Kazachstánu, biovar II je erytromycin

resistentní, nachází se zejména v Eurasii a biovar japonica se nachází v Japonsku.<sup>6, 41</sup>

*F. tularensis* subspecies *mediasiatica* se nachází ve středních asijských republikách bývalého Sovětského svazu. Virulencí je podobná *F. tularensis* subspecies *holarctica*, produkuje kyselinu z glycerolu. *F. tularensis* subspecies *novicida* je považovaný za nejméně virulentní a obvykle způsobuje onemocnění pouze u imunokomprimovaných hostitelů.<sup>41</sup>

Oslabením *F. tularensis* subsp. *holarctica* byl odvozen kmen *F. tularensis* LVS. Tento kmen má nízkou virulenci u lidí, ale u myši způsobuje smrtelné onemocnění, které se z hlediska histopatologie podobá lidské tularémii (LD<sub>50</sub> pro i.p. podání je 1 bakterie, LD<sub>50</sub> pro s.c. nebo i.d. podání je 1 x 10<sup>5</sup> bakterií). Proto je tento kmen využíván jako modelový intracelulární patogen, který by mohl pomoci objasnit imunologii a patogenezi *F. tularensis* i jiných intracelulárních patogenů.<sup>42</sup>

Pouze *F. tularensis* subsp. *tularensis* a subsp. *holarctica* způsobují onemocnění u člověka, končící často smrtí pacienta. Letální infekci vyvolá již 10 vdechnutých bakterií. Pro svoji extrémní nakažlivost různými cestami, nízkou infekční dávkou, snadné šíření aerosolem a schopnost způsobit těžké onemocnění a smrt jsou tyto dva poddruhy zařazeny do kategorie A možných prostředků bioterorismu.<sup>6, 42, 43</sup>

### 2.3.2 Tularémie

Původcem tularémie je *Francisella tularensis*. Vypuknutí choroby podobné moru mezi veverkami v Tulare County v Kalifornii v roce 1911 dovedlo McCoye a Chapina k objevení nového patogenu, který byl nazván *Bacterium tularense*. Díky výzkumu Edwarda Francise bylo zjištěno, že tato bakterie je také původcem několika chorob člověka. Tyto choroby jsou dnes souhrnně označovány jako tularémie. *Bacterium tularense* byla na počest Dr. Francise přejmenována na *Francisella tularensis*.<sup>42</sup>

Tularémie je typická infekce s přírodní ohniskovostí. Nákaza cirkuluje v přírodním ohnisku mezi vnímavými hlodavci (myši, křečci, myšice, krysy, lesní veverky, divocí králíci a zajáci). Sáním na nemocných zvířatech, u nichž před uhynutím dochází k masivní septikémii, se infikují členovci (např. klíšťata,

komáři, mouchy). Nákazu šíří dále a současně se uplatňují jako její rezervoár. Infekci udržují i méně vnímavá zvířata, která zpravidla onemocní jen latentně (ondatry, srny, lišky a divoce žijící ptáci). *F. tularensis* má zřejmě ještě další přírodní zdroj. Za jeden z možných rezervoárů jsou považovány améby, výskyt několika poddruhů je také spojen s vodou.<sup>6, 44</sup>

Člověk se může nakazit *F. tularensis* nejčastěji při manipulaci s infikovanými zvířaty, požitím kontaminované vody nebo potravy, kousnutím infikovaným hmyzem sajícího krev nebo vdechnutím aerosolu obsahujícím bakterie. Onemocnění se vyskytuje v několika formách, které souvisí se způsobem nákazy (respirační, glandulární a ulceroglandulární, orofaryngeální nebo gastrointestinální forma, které se mohou vyvinout ve formu tyfoidní). Společným znakem všech forem jsou symptomy podobnými chřipce, jako jsou bolest hlavy, horečka, třes, nevolnost, průjem, pneumonie a celková slabost. Bakterie se pomnoží v místě nákazy a poté se rozšíří do lymfatických uzlin, jater a sleziny.<sup>6, 41</sup>



## 2.4 Interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami

*F. tularensis* má schopnost infikovat množství lidských a zvířecích fagocytujících i nefagocytujících buněk (např. hepatocyty, fibroblasty, endoteliální a epiteliální buňky) a pomnožit se v nich. Obecně jsou za hlavní rezervoár *F. tularensis in vivo* považovány makrofágy (lidské, myší, krysí, králičí a morčecí).<sup>6, 44</sup>

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 tyto antimikrobiální efektorové molekuly. Porušení signální cesty vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- $\kappa$ B bylo pozorováno např. u druhů *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* a rodů *Salmonella* a *Yersinia*. Inhibiční mechanismus využívaný *F. tularensis* zatím nebyl pozorován u jiné intracelulární bakterie.<sup>44, 45</sup>

Podobně jako u jiných intracelulárních bakterií, je po infekci myší *F. tularensis* LVS vyvolána silná a dlouhotrvající primární imunitní odpověď zahrnující rychlou produkci IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, aktivaci makrofágů, neutrofilů a iNOS. Pro dlouhodobou kontrolu primární i sekundární infekce *F. tularensis* LVS je hlavní aktivace a pomnožení specifických T lymfocytů. Úloha B nebo NK buněk zatím nebyla plně objasněna.<sup>42</sup>

### 2.4.1 Interakce *F. tularensis* s makrofágy

Makrofágy jsou považovány za hlavní rezervoár *F. tularensis in vivo*. Extracelulárně *F. tularensis* interaguje s povrchovými molekulami makrofágů, dochází k aktivaci signálních cest vedoucích k transkripčním faktorům MAPK a NF- $\kappa$ B a následné sekreci prozánětlivých cytokinů, např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12. Porušení signalizace se objevuje až po internalizaci *F. tularensis*. Dochází k zablokování signálních cest vedoucích k NF- $\kappa$ B, p38 a c-Jun a potlačení produkce cytokinů. Během 30 minut po infekci makrofágů *F. tularensis* dochází k aktivaci Akt, což je proteinová kináza, která má vliv mimo jiné na průběh buněčného cyklu, přežívání buněk, genovou transkripci závislou na NF- $\kappa$ B a buněčnou migraci. V závislosti na podnětu může Akt aktivovat nebo inhibovat

transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Při stimulaci PDGF nebo TNF- $\alpha$  dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B a k produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů a zároveň k inhibici produkce IL-10. Při stimulaci vyvolané LPS dochází k inhibici NF- $\kappa$ B.<sup>6, 44, 45</sup>

Před fagocytózou mikroorganismů a částic dochází ke specifické interakci mezi receptory a ligandy umožněná polymerací aktinu. *F. tularensis* je obkloповána panožkami, které se během několika sekund až minut změni ve fagozóm. Tvorbu asymetrických prostorných panožek spouští nejen živé, ale také formalínem nebo teplem usmrcené bakterie, není tedy závislá na metabolické aktivitě bakterie.<sup>6, 46, 47</sup>

Důležitou roli při zastavení zrání fagozómu ve fázi pozdního endozómu 2-4 hodiny po infekci zřejmě hrají tularemické proteiny IglA, IglC, PdpA a PdpD, kódované geny označované jako FPI a jejich regulátory Mg1A a Mg1B. Tato oblast je mezi ostatními bakteriálními druhy ojedinělá. Při pokusech, kdy geny této oblasti byly inaktivovány, bakterie nebyly schopné uniknout z fagozómu a pomnožit se uvnitř hostitelské buňky. Dalšími proteiny, které mají vliv na intracelulární přežití bakterie, jsou alanin racemáza, glutamin fosforibosylpyrofosfát amidotransferáza a ClpB proteáza.<sup>44, 47</sup>

## 2.4.2 Interakce *F. tularensis* s B buňkami

### 2.4.2.1 Úloha B buněk během časně imunitní odpovědi k *F. tularensis*

Úloha B buněk v průběhu časně imunitní odpovědi nebyla dlouhou dobu známa. B buňky byly, jako hlavní složka adaptivní imunity, spojovány pouze s tvorbou protilátek. Při infekci intracelulárními patogeny mají ale protilátky pouze omezený význam. Patogenní mikroorganismy jsou lokalizovány uvnitř buňky, která ho chrání před účinným navázáním protilátek.<sup>29, 42</sup>

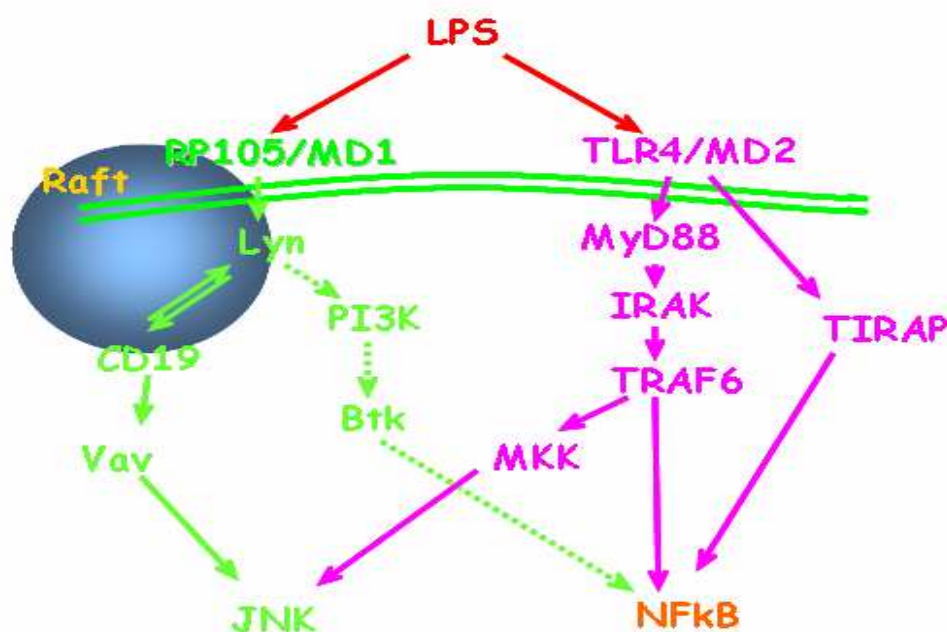
Zvláštností pozorovanou u myši infikovaných *F. tularensis* LVS je vytvoření silné ochrany proti letální dávce v krátké době po podání subletální dávky: myši po i.d. podané subletální dávce  $1 \times 10^3$  LVS jsou schopné přežít letální i.p. nebo i.v. podanou dávku více než  $10^6$  násobku LD<sub>50</sub> po 3 dnech od prvotní subletální dávky. Takto vzniklá ochrana je nespecifická, nezávislá na T lymfocytech a trvá přibližně 1 měsíc. Důležitou roli zde nejspíše hrají B buňky, nezávisle na tvorbě protilátek, produkcí rozpustných mediátorů s místním nebo systémovým účinkem. B buňky jsou schopny sekretovat mnoho mediátorů,

např. IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 a TNF- $\alpha$  a  $\beta$ , ale ne IFN- $\gamma$ . IL-6, IL-12 a TNF- $\alpha$  a  $\beta$  jsou důležité cytokiny pro regulaci produkce IFN- $\gamma$  a aktivaci makrofágů během intracelulární infekce včetně *F. tularensis* LVS. B buňky by mohly přímo interagovat s jinými buňkami, např. s NK buňkami, jejichž aktivace vede ke zvýšené produkci IFN- $\gamma$ . Také by mohly produkovat mediátory, které během *F. tularensis* LVS infekce nejsou jinými buňkami vytvářeny, nebo produkcí cytokinů výrazně zesilovat cytokinovou odpověď.<sup>42, 48, 49</sup>

Silným stimulantem B buněk je LPS gramnegativních bakterií. B buňky exprimují na svém povrchu dva receptory z rodiny TLR pro LPS, a to TLR4 a RP105 (neboli CD180), jejichž aktivací se spustí dvě nezávislé signální cesty. Zatímco TLR4 je exprimován na různých typech buněk imunitního systému, 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- $\kappa$ B. Signální cesta závislá na adaptorovém proteinu MyD88 vede přes TLR4, IRAK a TRAF6 k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B.<sup>50</sup>

Proliferace B buněk a tvorba polyklonálních protilátek po infekci gramnegativními bakteriemi je ovlivňována enzymem AOAH hostitelské buňky. AOAH selektivně odstraňuje sekundární acyly navázané na lipid A LPS, a tím vzniká částečně deacylovaný LPS s účinností asi 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. AOAH je produkován hlavně monocyty a makrofágy, dendritickými buňkami, neutrofily a epiteliálními buňkami dřeně ledvin. AOAH neovlivňuje syntézu protilátek závislou na T lymfocytech.<sup>51</sup>

### Indukce aktivace B-buněk pomocí LPS



Obr. 3 Aktivace B buněk pomocí LPS

#### 2.4.2.2 Přímá interakce B buněk s *F. tularensis*

Přímé interakce mezi intracelulárními patogeny a B buňkami zatím nebyly příliš zkoumány. Menon a kol. popsali schopnost intracelulární bakterie *Listeria monocytogenes* infikovat a zabít B buňky jako jednu z možných strategií zahájení infekce. *L. monocytogenes* 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.<sup>52</sup>

Nedávno byla objevena také schopnost přímé interakce B buněk s *F. tularensis*. S použitím transmisní elektronové mikroskopie byly sledovány myší (A20) a lidské (Ramos) B buněčné linie. Do 24 hodin po infekci došlo k infikaci více než 20 % buněk. Živé bakterie způsobily apoptózu u buněčné linie Ramos a slezinných myších CD19<sup>+</sup> 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 % apoptotických buněk.<sup>53</sup>

## 3 Experimentální část

### 3.1 Seznam použitého materiálu

#### 3.1.1 Buněčné linie a bakterie

Ramos – lidská B buněčná linie (ATCC CRL-1596)

*Francisella tularensis* FSC200 (FOI Umea, Švédsko)

*Francisella tularensis* LVS (ATCC 29684)

#### 3.1.2 Primery pro RT-PCR

**$\beta$ -actin** (Invitrogen)

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

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

**$\beta_2$ -microglobulin** (GeneriBiotech)

**$\beta_2$ -microglobulin II** (GeneriBiotech)

**GM-CSF** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - TGT GGT CTA CAG CCT CTC AGC AC - 3'

Antisense: 5' - CAA AGG GGA TAT CAG TCA GAA AGG T - 3'

**IFN- $\beta$**  (GeneriBiotech)

Sense: 5' - AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG C - 3'

Antisense: 5' - GTT TCG GAG GTA ACC TGT - 3'

**IFN- $\gamma$**  (GeneriBiotech)

Sense: 5' - AGA GTG TGG AGA CCA TC - 3'

Antisense: 5' - CTT TGC GTT GGA CAT TCA - 3'

**IFN- $\gamma$  II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - GTT TTG GGT TCT CTT GGC TGT TA - 3'

Antisense: 5' - AAA AGA GTT CCA TTA TCC GCT ACA TC - 3'

**IL-1 $\beta$**  (GeneriBiotech)

Sense: 5' - ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T - 3'

Antisense: 5' - CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT - 3'

**IL-1β III** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CTA CGA ATC TCC GAC CAC CAC - 3'

Antisense: 5' - GTT TCT TCT TCT ACC TTT TCG C - 3'

**IL-2** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC - 3'

Antisense: 5' - GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A - 3'

**IL-4** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT - 3'

Antisense: 5' - GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC - 3'

**IL-6** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T - 3'

Antisense: 5' - CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC - 3'

**IL-8** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - GAA TGG GTT TGC TAG AAT GT - 3'

Antisense: 5' - AGA CTA GGG TTG CCA GA - 3'

**IL-10 II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT - 3'

Antisense: 5' - CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT CT - 3'

**IL-12 II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CAT GGT GGA TGC CGT TCA - 3'

Antisense: 5' - ACC TCC ACC TGC CGA GAA T - 3'

**IL-15 II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CCA TCC AGT GCT ACT TGT GTT TAC TT - 3'

Antisense: 5' - CCA GTT GGC TTC TGT TTT AGG AA - 3'

**IL-15 III** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CTG TTT CAG TGC AGG GCT TCC - 3'

Antisense: 5' - GTG AAG AAC TAA CGT TAA CTA AG - 3'

**IP-10** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CAG AAT CGA AGG CCA TCA - 3'

Antisense: 5' - CCT CTG TGT GGT CCA TC - 3'

**IRF-3** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - GAT CTG ATT ACC TTC ACG GA - 3'

Antisense: 5' - ACC TTG ACC ATC ACG AG - 3'

**LT- $\alpha$  III** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - TGA CAC CAC CTG AAC GTC TC - 3'

Antisense: 5' - GAA GGA GGT CCT ACC AAA GAG - 3'

**TGF- $\beta$**  (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CTC CCA CTC CCG TGG CTT CTA G - 3'

Antisense: 5' - GTT CCA CAT GTT GCT CCA CAC TTG - 3'

**TGF- $\beta$  II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CAA GGG CTA CCA TGC CAA CT - 3'

Antisense: 5' - AGG GCC AGG ACC TTG CTG - 3'

**TLR-7** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - GAA ACC CCG TCT GTA CT - 3'

Antisense: 5' - GTG ATC TCG GCT CAC TG - 3'

**TLR-8** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - AGG CTA CAG GTC TCT TT- 3'

Antisense: 5' - TTG TCT CGG CTC TCT TC - 3'

**TNF- $\alpha$**  (GeneriBiotech)

Sense: 5' - TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC - 3'

Antisense: 5' - GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG - 3'

**TNF- $\alpha$  II** (GeneriBiotech)

Sense: 5' - CCC CAG GGA CCT CTC TCT AAT C - 3'

Antisense: 5' - GGT TTG CTA CAA CAT GGG CTA CA - 3'

**TNFR-CD40** (GeneriBiotech)

Sense: 5'- TTG TGA TAG TGA ACA ACT GGA - 3'

Antisense: 5'- CCA TAC CCA TCA TTC AGC - 3'

**TNFR-NFκB** (GeneriBiotech)

Sense: 5'- GGA TTA CAG GCG TGA GC - 3'

Antisense: 5'- TCC TAG CAA CTT AGC AAC TAT- 3'

### 3.1.3 Média, roztoky a chemikálie

0,5% roztok trypanové modři v PBS

0,5x TBE pufr

1 kB Plus DNA Ladder (Invitrogen)

1x FA Gel Running Buffer

10x PBS

10x FA Gel Buffer

10x PCR Rxn Buffer (Invitrogen)

10x TBE pufr

10x TrueStart Taq Buffer (Fermentas)

5x First Strand Buffer (Invitrogen)

96% ethanol (Lachema)

β-mercaptoethanol, 14,3 M (Sigma)

dATP, 100 mM (Invitrogen)

dCTP, 100 mM (Invitrogen)

dGTP, 100 mM (Invitrogen)

dTTP, 100 mM (Invitrogen)

DTT, 0,1 M (Invitrogen)

EDTA (Serva)

Ethidium bromid, 10 mg/ml (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Glycerol (Fluka)

Chloroform (Lachema)

IgIC (Apronex)

Isopropylalkohol (Lachema)



Kultivační médium Dulbecco (s glutamaxem)  
 Kultivační pevné půdy McLeod  
 Kyselina chlorovodíková 35% (Lachema)  
 LPS (*E. coli*), 1 µg/ml (Sigma)  
 MgCl<sub>2</sub>, 50 mM (Invitrogen)  
 MOPS, 200mM (Fluka)  
 Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer, 0,5 µg/µl (Invitrogen)  
 pUC Mix Marker 8, 0,5 µg/µl (Fermentas)  
 RLT pufr (Qiagen)  
 Rnase<sup>-</sup> voda (Invitrogen)  
 RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor, 40 U/µl (Invitrogen)  
 RPE pufr (Qiagen)  
 RW1 pufr (Qiagen)  
 Sodium acetate, 50 mM (Fluka)  
 T18VN Oligo Primer, 0,1 mM (GeneriBiotech)  
 Taq DNA polymerase (Invitrogen)  
 Trackit Cyan/Orange Loading Buffer (Invitrogen)  
 TRIS (Serva)  
 TRIzol (Invitrogen)  
 TrueStart Taq DNA polymerase (Fermentas)

### 3.1.4 Přístroje a laboratorní pomůcky

Automatické pipety 1, 10, 20, 100 a 1000 µl (Eppendorf)  
 Bakteriální kličky (TPP)  
 Centrifuga BR4i (Jouan)  
 Centrifuga Pico (Heraeus)  
 Denzitometr C08000 (WPA Bioware)  
 Elektroforetická vana Mupid (LabMark)  
 Forma na gely, hřebínky na gely  
 Kádinky  
 Kolonky pro izolaci RNA Rneasy mini column (Qiagen)  
 Kultivační lahve (TPP)  
 Kyvety (Scholler)

Laboratorní váhy (Kern)  
Latexové rukavice (Hartmann)  
Magnetická míchačka (Ika)  
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)  
Spektrofotometr Spekol (Helios)  
Spektrofotometr NanoPhotometer (Implen)  
Sterilní škrabky (Lukasterik)  
Špičky 1, 10, 20, 100 a 1000  $\mu$ l (Eppendorf)  
Termocycler PTC-200 (Biotech)  
Termostat (Assistent)  
Třepačka MS2 (Ika)  
Zkumavky na infekci o objemu 15 ml (TPP)

### **3.1.5 Příprava roztoků**

#### **10x FA Gel Buffer**

Pufir byl připraven rozpuštěním 2,09 g 200mM MOPS, 0,21 g 50 mM Sodium acetate a 10 mM EDTA v 50 ml RNase<sup>-</sup> vody. Úprava pH na hodnotu 7,0 byla provedena hydroxidem sodným.

#### **1x FA Gel Running Buffer**

Pro přípravu pufru bylo odpipetováno 10 ml 10x FA gel pufru, 2 ml 37% formaldehydu a doplněno 88 ml RNase<sup>-</sup> vody.

#### **1,2% agarózový gel**

1,2% agarózový gel pro kontrolu kvality RNA byl připraven rozpuštěním 0,48 g agarózy ve 4 ml 10x FA pufru a 36 ml RNase<sup>-</sup> vody.

### **10 mM dNTP mix**

Napipetováním 10  $\mu$ l dATP, 10  $\mu$ l dCTP, 10  $\mu$ l dGTP, 10  $\mu$ l dTTP a 60  $\mu$ l Rnase<sup>-</sup> vody byla připravena 10 mM směs deoxyribunukleotidtrifosfátů.

### **10x TBE pufr**

Zásobní roztok 5x TBE pufru byl připraven navážením 54 g TRIS, 27,5 g kyseliny borité, přidáním 20 ml 0,5 M EDTA a doplněním do 500 ml deionizovanou vodou. Úprava pH na hodnotu 8,0 byla provedena kyselinou chlorovodíkovou. Roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

### **0,5x TBE pufr**

0,5x TBE pufr byl získán dvacetinásobným naředěním 10x TBE pufru. K 950 ml deionizované vody bylo přidáno 50 ml 10x TBE pufru.

### **1,5% agarózový gel**

Pro přípravu 1,5% agarózového gelu bylo rozpuštěno 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru.

## 3.2 Pracovní postup

### 3.2.1 Příprava buněčné suspenze

#### 3.2.1.1 Rozmrazování buněčných suspenzí

Kryozkumavka obsahující zamrazenou buněčnou kulturu byla vyjmuta z mrazícího boxu s kapalným dusíkem a rychle rozmrazena pod tekoucí teplou vodou. Ve sterilním boxu byl obsah kryozkumavky přenesen pipetou do nové zkumavky a bylo přidáno malé množství kultivačního média. Zkumavka byla centrifugována 5 minut při 300 g. Poté byl odstraněn supernatant. K buněčným peletám bylo přidáno malé množství kultivačního média a byly řádně protřepány. Buněčná suspenze byla přenesena pipetou do kultivační láhve s obsahem dna 25 cm<sup>2</sup>. K suspenzi bylo přidáno 10 ml kultivačního média a mírně pootevřená kultivační láhev byla uložena do termostatu. Kultivace probíhala 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO<sub>2</sub>. Za 24 hodin bylo z buněčné kultury odebráno 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4).

#### 3.2.1.2 Zamrazování buněčných suspenzí

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

Kultivační láhev obsahující buněčnou kulturu v kultivačním médiu byla zkontrolována pod inverzním mikroskopem. Byla hodnocena hustota a kvalita buněk a čistota média. Po zhodnocení bylo odebráno 10 µl na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4) a poté provedeno pasážování buněk (kapitola 3.2.1.3).

Buněčná suspenze byla ve sterilním boxu přenesena z kultivační láhve do zkumavky. Zkumavka byla centrifugována 5 minut při 300 g a vzniklý supernatant byl odstraněn. K buněčným peletám bylo přidáno zamrazovací médium (na  $1 \cdot 10^6$  buněk připadá 1 ml zamrazovacího média), obsah byl řádně protřepán a přenesen pipetou do kryozkumavek. Kryozkumavky byly vloženy do polystyrenového obalu a zamrazeny na -80 °C. Druhý den byly kryozkumavky přeneseny do mrazícího boxu s kapalným dusíkem.

### 3.2.1.3 Kultivace a pasážování buněk

Buněčná kultura v kultivační láhvi byla zkontrolována pod inverzním mikroskopem. Byla hodnocena hustota a kvalita buněk a čistota média. Ve sterilním boxu byla uzavřená kultivační láhev řádně protřepána. Pipetou bylo asepticky odebráno 10  $\mu\text{l}$  na určení koncentrace a životnosti buněk (kapitola 3.2.1.4). V kultivační láhvi bylo ponecháno pouze takové množství buněčné kultury, které bylo potřebné pro další růst. K buněčné kultuře bylo přidáno kultivační médium podle tabulky 1. Mírně pootevřená kultivační láhev byla vložena do termostatu a inkubována při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO<sub>2</sub>.

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

Obsah dna kultivační láhve (cm <sup>2</sup> )	Množství buněčné kultury (počet buněk)	Množství kultivačního média (ml)
150	3-4 · 10 <sup>6</sup>	do 50
75	1-2 · 10 <sup>6</sup>	do 20
25	0,5-1 · 10 <sup>6</sup>	do 10

### 3.2.1.4 Určení koncentrace a životnosti buněk

Z protřepané buněčné suspenze bylo asepticky odebráno 10  $\mu\text{l}$ , smícháno s 10  $\mu\text{l}$  trypanové modři a směs byla naplněna Bürkerova počítací komůrka. Pod světelným mikroskopem byly počítány buňky uvnitř a na obvodu dvou zvolených stran ve 25 čtvercích. Byl zjišťován počet živých a mrtvých buněk. Mrtvé buňky byly zbarveny modře. Součet byl proveden dvakrát.

#### Určení životnosti

Ze zjištěných údajů byl vypočítán průměrný počet živých a mrtvých buněk. Jejich součtem byl získán průměrný počet všech buněk. Životnost (v %) byla 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 bylo vypočítáno podle vzorce:

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

ředění trypanovou modří ..... 2

koeficient Bürkerovy komůrky ..... 10 000

#### **3.2.1.5 Příprava buněčné suspenze linie Ramos pro infekci**

Z protřepané buněčné suspenze linie Ramos bylo asepticky odebráno 10  $\mu$ l, smícháno s 10  $\mu$ l trypanové modří a určena koncentrace a životnost buněk (kapitola 3.2.1.4). Podle potřebné koncentrace buněk v 1 ml byl vypočítán objem buněčné suspenze odpovídající celkovému počtu buněk. Daný objem buněčné suspenze byl asepticky pipetou odebrán z kultivační láhve, přemístěn do zkumavky a centrifugován 7 minut při 300 g. Poté byl odstraněn supernatant. Pelety byly roztřepány a doplněny kultivačním médiem do objemu potřebného pro infekci.

### **3.2.2 Příprava bakteriální suspenze**

#### **3.2.2.1 Příprava bakteriální suspenze *F. tularensis* FSC200**

Na 3 plotny McLeod byla masivně naočkována bakterie *F. tularensis* FSC200. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Za 24 hodin byly plotny vyjmuty z termostatu. Ve sterilním boxu byla bakteriální kličkou opatrně setřena z plotny část bakteriální kultury. Klička byla otírána o vlhkou stěnu zkumavky obsahující 4 ml PBS tak, aby na stěně nezůstaly žádné shluky bakterií. Poté byla změřena optická denzita bakteriální suspenze oproti 4 ml PBS. Postup byl opakován do dosažení optické denzity přibližně 1,0, která odpovídala koncentraci  $5 \cdot 10^9$  bakterií v 1 ml PBS.

Bakteriální suspenze byla rozdělena po 1 ml do plastových zkumavek a centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce. Pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml kultivačního média.

### 3.2.2.2 Příprava bakteriální suspenze zabitě *F. tularensis* FSC200

Na 4 plotny McLeod byla masivně naočkována bakterie *F. tularensis* FSC200. Poté byla připravena, stejným způsobem jako v kapitole 3.2.2.1, bakteriální suspenze o koncentraci  $5 \cdot 10^9$  bakterií v 1 ml PBS a optické denzité přibližně 1,0. Bakteriální suspenze byla centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce a k peletám byl přidán 1 ml 37% formaldehydu. Zkumavka s bakteriální suspenzí byla vložena do termostatu a inkubována 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinách byla zkumavka vyjmuta z termostatu a centrifugována 7 minut při 8 000 g. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce a pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml PBS.

Pro kontrolu životnosti bakterií byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze a nanesen na 2 plotny McLeod. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Zbývající množství bakteriální suspenze bylo rozděleno po 1 ml do plastových zkumavek a centrifugována 7 minut při 8 000 g a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn do roztoku dezinfekce. Pelety byly resuspendovány přidáním 1 ml kultivačního média.

### 3.2.2.3 Výsev a odečet CFU

Do osmi plastových zkumavek bylo napipetováno 450 µl PBS a zkumavky byly označeny řadou  $10^{-1}$  až  $10^{-8}$ . Do zkumavky s označením  $10^{-1}$  bylo přeneseno pipetou 50 µl buněčné suspenze s optickou denzitou přibližně 1,0. Novou špičkou byla suspenze promíchána a odebráno 50 µl do zkumavky s označením  $10^{-2}$ . Stejným způsobem bylo postupováno v celé řadě. Ze zkumavky s označením  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  bylo 50 µl přeneseno na suché plotny McLeod a sterilní hokejkou opatrně rozetřeno do vsáknutí. Vše bylo prováděno duplicitně, byly spotřebovány 4 plotny McLeod. Plotny byly vloženy do termostatu a inkubovány 72 hodin při teplotě 37 °C.

Za 72 hodin byly spočítány všechny kolonie narostlé na každé plotně. Koncentrace kolonií v 1 ml bakteriální suspenze byly vypočítány podle vzorce:

*počet kolonií na plotně*  $\times$  *ředění 1*  $\times$  *ředění 2*

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

ředění 2 .....  $1\ 000\ \mu\text{l} / 50\ \mu\text{l} = 20$

### 3.2.3 Detekce genové exprese metodou RT-PCR

#### 3.2.3.1 Infekce a stimulace buněk Ramos

##### Experiment č. 1

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml. Podle kapitol 3.2.2.1 a 3.2.2.2 bylo připraveno potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci  $5 \cdot 10^9$  živých bakterií/ml a  $5 \cdot 10^9$  mrtvých bakterií/ml. Multiplicita infekce (MOI) byla 500. Byl použit zásobní roztok LPS (*E. coli*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při stimulaci byla 20 µg/ml. Bylo pracováno v triplicitě.

Infekce a stimulace buněk Ramos byla prováděna ve zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 2.

**Tab. 2** Množství buněčné suspenze, bakteriálních buněk a LPS použitých při infekci a stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	<i>F. tularensis</i> FSC200	Zabitá <i>F. tularensis</i> FSC200	LPS
Kontrolní buňky	1 ml	-	-	-
Infikované FSC200	1 ml	500 µl	-	-
Infikované zabitou FSC200	1 ml	-	500 µl	-
Stimulované LPS	1 ml	-	-	20 µl

Zkumavky byly naplněny podle tabulky a mírně pootevřené vloženy do termostatu. Byly inkubovány 6 a 24 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Po 6 hodinách byly vyjmuty zkumavky pro 6hodinový interval a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn do dezinfekce a pelety resuspendovány přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Poté byl úplně odstraněn supernatant. Vzniklé pelety byly zamraženy na -80°C nebo byly použity na izolaci RNA pomocí TRIzol (kapitola 3.2.3.2).



Po 24 hodinách byly vyjmuty zkumavky pro 24hodinový interval a postupováno stejným způsobem. Suché pelety byly zamraženy na  $-80^{\circ}\text{C}$  nebo použity pro následnou izolaci RNA pomocí TRIzol.

### Experiment č. 2

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml. Suspenze byla rozdělena po 1 ml do 4 plastových zkumavek. Vzorky byly centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ . Poté byl úplně odstraněn supernatant. Dvě zkumavky byly použity pro izolaci pomocí TRIzol a dvě pro izolaci pomocí RNeasy Mini Kit (kapitola 3.2.3.2).

### Experiment č. 3

Infekce a stimulace buněk Ramos č. 3 probíhala stejně jako v případě buněk č.1. Vzniklé pelety po 6hodinové a 24hodinové inkubaci byly poté zamraženy na  $-80^{\circ}\text{C}$  nebo byly použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit (kapitola 3.2.3.2).

### Experiment č. 4

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml. Byl použit zásobní roztok LPS (*E. coli*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při stimulaci byla  $20 \mu\text{g/ml}$ . Bylo pracováno v triplicitě. Stimulace buněk Ramos byla prováděna ve zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 3.

**Tab. 3** Množství buněčné suspenze a LPS použitých při stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	LPS
Kontrolní buňky	1 ml	-
Stimulované LPS	1 ml	80 $\mu\text{l}$

Zkumavky byly naplněny podle tabulky a mírně pootevřené vloženy do termostatu. Byly inkubovány 24 hodin při  $37^{\circ}\text{C}$  a 5 %  $\text{CO}_2$ .

Po 24 hodinách byly zkumavky vyjmuty z termostatu a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety resuspendovány přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Poté byl úplně odstraněn supernatant. Vzniklé pelety byly zamraženy na -80°C nebo byly použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit (kapitola 3.2.3.2).

### Experiment č. 5

Podle kapitoly 3.2.1.5 bylo připraveno potřebné množství buněčné suspenze Ramos o koncentraci  $5 \cdot 10^6$  buněk/ml. Podle kapitol 3.2.2.1 a 3.2.2.2 bylo připraveno potřebné množství bakteriální suspenze o koncentraci  $5 \cdot 10^9$  živých bakterií/ml a  $5 \cdot 10^9$  mrtvých bakterií/ml. Byl použit zásobní roztok LPS (*E. coli*) o koncentraci 1 mg/ml PBS, výsledná koncentrace při stimulaci byla 20 µg/ml. Dále byl použit rekombinantní protein IgIC o koncentraci 0,1 mg/ml pufru, výsledná koncentrace při stimulaci byla 5 ng/ml. Bylo pracováno v triplicitě.

Infekce a stimulace buněk Ramos byla prováděna ve zkumavkách o objemu 15 ml ve sterilním boxu. Obsah jednotlivých zkumavek je vyjádřen v tabulce 4.

**Tab. 4** Množství buněčné suspenze, bakteriálních buněk, LPS a IgIC použitých při infekci a stimulaci buněk Ramos

Vzorky	Buněčná suspenze	<i>F. tularensis</i> FSC200	Zabitá <i>F. tularensis</i> FSC200	LPS	IgIC
Kontrolní buňky	1 ml	-	-	-	-
Infikované FSC200	1 ml	500 µl	-	-	-
Infikované zabitou FSC200	1 ml	-	500 µl	-	-
Stimulované LPS	1 ml	-	-	20 µl	-
Stimulované IgIC	1 ml	-	-	-	5 µl

Zkumavky byly naplněny podle tabulky a mírně pootevřené vloženy do termostatu. Byly inkubovány 6 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Poté byly zkumavky pro 6hodinový interval vyjmuty a centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn do dezinfekce a pelety resuspendovány přibližně 10 ml PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány 7 minut při 300 g a teplotě 4 °C. Poté byl úplně odstraněn supernatant. Vzniklé pelety byly zamrazeny na -80 °C nebo byly použity na izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit (kapitola 3.2.3.2).

Po 12 a 24 hodinách bylo postupováno stejným způsobem. Suché pelety byly zamrazeny na -80°C nebo použity pro následnou izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit.

### **3.2.3.2 Izolace RNA**

#### Izolace RNA pomocí TRIzol

K rozmraženým, suchým, buněčným peletám byl ve sterilním boxu přidán 1 ml TRIzol. Obsah zkumavky byl pomocí pipety resuspendován a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Po 5 minutách bylo do každé zkumavky přidáno 0,2 ml chloroformu, obsah důkladně 15 sekund v ruce protřepán a inkubován 2-3 minuty při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky centrifugovány 15 minut při méně než 12 000 g a teplotě 4 °C. Po centrifugaci byly získány 3 fáze: dolní obsahovala DNA a proteiny, mezifáze obsahovala DNA a vrchní obsahovala RNA. Opatrně bylo odebráno přibližně 500 µl z vrchní vodní fáze tak, aby nebyla porušena mezifáze. Obsah vrchní fáze byl přenesen do nové plastové zkumavky a bylo přidáno 0,5 ml isopropylalkoholu. Zkumavky byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě a centrifugovány 10 minut při méně než 12 000 g a 4 °C. Po centrifugaci byl opět odstraněn supernatant. Do každé zkumavky byl přidán 1 ml 75% ethanolu, obsah byl opatrně protřepán a centrifugován 5 minut při 7 500 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl pečlivě pipetou odstraněn a pelety vysušeny. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v 30 µl RNase<sup>-</sup> vody a inkubována 10 minut při 56 °C v termobloku.

Poté bylo z každé zkumavky odebráno 5  $\mu$ l RNA pro měření na spektrofotometru a 5  $\mu$ l RNA pro měření kvality RNA na FA gelu (viz. kapitola 3.2.3.3). Zbývající RNA byla zamrzena na  $-80$  °C.

#### Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit

Izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit byla provedena za laboratorní teploty, jenž nesměla být během centrifugace nižší než 20 °C. Doporučené množství pro tuto metodu bylo  $3-4 \cdot 10^6$  buněk.

K rozmraženým, suchým, buněčným peletám bylo přidáno 600  $\mu$ l směsi RLT pufru s  $\beta$ -merkptoethanolem (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkptoethanolu na 1 ml RLT pufru). Obsah zkumavky byl promíchán pipetou a poté homogenizován pomocí injekční stříkačky s jehlou o průměru 0,9 mm. K lyzátům bylo přidáno 600  $\mu$ l 70% ethanolu a obsahy zkumavek promíchány pipetou. 700  $\mu$ l z každého vzorku bylo pipetou přeneseno na kolonky RNeasy mini column umístěných v plastových zkumavkách o objemu 2 ml. Zkumavky byly opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000g. Z plastových zkumavek umístěných pod kolonkami byl odstraněn proteklý ethanol. Pokud byl objem vzorku větší než 700  $\mu$ l, byl zbytek vzorku opět nanesen na kolonky, zkumavky opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000g. Poté byl opět odstraněn proteklý ethanol. Ke vzorkům na kolonkách bylo přidáno 700  $\mu$ l RW1 pufru, zkumavky opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Plastové zkumavky obsahující proteklý pufr byly odstraněny a nahrazeny čistými. Na kolonky bylo napipetováno 500  $\mu$ l RPE pufru, zkumavky opatrně uzavřeny a centrifugovány 15 sekund při více než 8 000 g. Z plastových zkumavek byl odstraněn proteklý pufr, na kolonky bylo opět napipetováno 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugováno 2 minuty při více než 8 000 g. Kolonky RNeasy mini column byly umístěny na čisté plastové zkumavky s víčkem o objemu 1,5 ml. Na membrány kolonek bylo napipetováno 30  $\mu$ l Rnase<sup>-</sup> vody, zkumavky uzavřeny a centrifugovány 1 minutu při více než 8 000g. Pro zvýšení výtěžnosti byl ještě jednou zopakován eluční krok a na kolonku bylo napipetováno 30  $\mu$ l eluátu a centrifugováno 1 minutu při více než 8 000 g.

Poté bylo z každé zkumavky odebráno 5  $\mu$ l RNA pro měření na spektrofotometru a 5  $\mu$ l RNA pro měření kvality RNA na FA gelu (viz. kapitola 3.2.3.3). Zbývající RNA byla zamrzána na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3.3 Stanovení koncentrace RNA

#### Měření RNA na spektrofotometru

Z izolované RNA v RNase<sup>-</sup> vodě bylo pipetou odebráno 5  $\mu$ l do sterilní plastové zkumavky s víčkem a naředěno RNase<sup>-</sup> vodou 100x (495  $\mu$ l RNase<sup>-</sup> vody). RNA byla měřena na spektrofotometru v programu Nucleid acide 260/280. Z hodnot absorbance při 260 nm byla přepočtem zjištěna koncentrace RNA v  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  vzorku. Z hodnoty poměru absorbancí při 260 a 280 nm byla zjištěna čistota RNA. Tato hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 1,7-2,0. Jako slepý vzorek bylo použito 0,5 ml RNease<sup>-</sup> vody.

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

*absorbance při 260 nm x ředění x faktor*

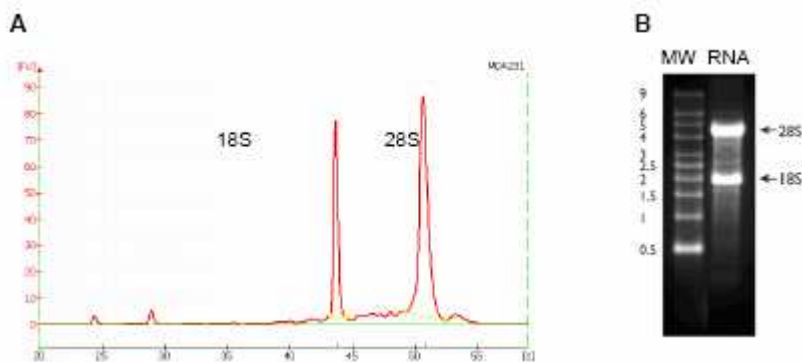
ředění ..... 100

faktor ..... 40

#### Měření kvality RNA na gelu

Chemikálie na 1,2% agarózový gel byly zahřívány v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. Směs byla po vychladnutí nalita do připravené formy s hřebínkem. Poté byl gel umístěn do elektroforetické vany naplněné 1x FA Gel Running Buffer a přibližně 30 minut equilibrován. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 5  $\mu$ l vzorku RNA smíšené s 1  $\mu$ l glycerolu a s 1  $\mu$ l Loading Buffer. Elektroforéza byla prováděna při napětí 100 V po dobu 30 minut. Po skončení elektroforézy byl gel 5 minut barven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 15 minut odbarvován v deionizované vodě. Poté byl gel hodnocen pod UV lampou.

Eukaryotická RNA je na gelu charakterizována 2 silnými proužky (28S-4,7 kbp a 18S-1,9 kbp, je také možný 5S proužek).



Obr. 4 Detekce RNA

### 3.2.3.4 Syntéza cDNA

Do PCR zkumavek umístěných na ledu byla napipetována směs vzorků RNA a RNase<sup>-</sup> vody o celkovém objemu 15,5  $\mu$ l. Pro reakci bylo použito 2  $\mu$ g RNA od každého vzorku. Množství použité RNA v  $\mu$ l byla zjištěna přepočtem z koncentrace RNA v  $\mu$ g/ $\mu$ l získané v kapitole 3.2.3.3. Ke každému vzorku byl přidán 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>12-18</sub> primeru. Směs byla promíchána a inkubována 10 minut při 95 °C v termocykleru.

Po 10 minutách byly vzorky vyndány na led. Ke každému vzorku bylo přidáno 13,5  $\mu$ l RT mixu:

6,0  $\mu$ l 5x First Strand Buffer

3,0  $\mu$ l DTT (0,1 M)

1,0  $\mu$ l RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 U)

2,5  $\mu$ l dNTP (10 mM)

1,0  $\mu$ l Superscript RNase Reverse Transcriptase (400 U)

Vzorky byly promíchány a inkubovány v termocykleru při teplotním profilu:

37 °C 60 minut

42 °C 30 minut

70 °C 5 minut

4 °C  $\infty$

Po proběhlé syntéze cDNA byly vzorky zamraženy na -20 °C.

### 3.2.3.5 Amplifikace cDNA

Do PCR zkumavek umístěných na ledu bylo napipetováno 20  $\mu\text{l}$  PCR mixu a 5  $\mu\text{l}$  směsi cDNA a RNase<sup>-</sup> vody. Pro amplifikaci byla připravena také pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla dodána komerčně nebo připravena tisícinásobným zředěním ze vzorku pozitivního při dané amplifikaci. V negativní kontrole byla nahrazena cDNA 1,0  $\mu\text{l}$  RNase<sup>-</sup> vody.

PCR mix:

- 10,0  $\mu\text{l}$  RNase<sup>-</sup> voda
- 5,0  $\mu\text{l}$  10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>)
- 1,5  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1,0  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM)
- 1,0  $\mu\text{l}$  Primer Sense (10  $\mu\text{M}$ )
- 1,0  $\mu\text{l}$  Primer Antisense (10  $\mu\text{M}$ )
- 0,5  $\mu\text{l}$  Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )

Vzorky byly promíchány a inkubovány v termocykleru při následujícím teplotním profilu, kroky 2-4 byly opakovány podle použitého primeru 28-35krát:

:	94 °C	5 minut
	94 °C	30 sekund
	55-60 °C	60 sekund
	72 °C	45 sekund
	72 °C	5 minut
	4 °C	$\infty$

#### Standardizace na $\beta$ -actin

Vzorky cDNA byly nejprve amplifikovány s použitím primerů pro gen pro  $\beta$ -actin. Tento gen je aktivovaný u všech buněk a slouží ke kvantitativní standardizaci exprese genů jednotlivých vzorků cDNA. Produktem byly stejně intenzivní proužky na gelu detekované UV lampou. Pokud proužky měly různou intenzitu, bylo upraveno množství cDNA použité pro amplifikaci.

### Amplifikace cDNA s použitím různých primerů

Ke standardizovanému množství cDNA byly přidány primery pro geny pro IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IP-10, IRF-3, LT- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNFR-CD40, TNFR-NF $\kappa$ B, TLR-7 a TLR-8. Pro amplifikaci byl měněn počet cyklů, teplota „annealing“, koncentrace MgCl<sub>2</sub>, koncentrace dNTP a koncentrace Taq DNA polymerázi tak, aby výsledné produkty byly co nejvíce rozlišené. Intenzita proužků na gelu byla porovnána se standardními produkty amplifikace s primery pro  $\beta$ -actin.

#### **3.2.3.6 Elektroforéza**

Pro elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel. V mikrovlnné troubě byl zahřátím rozpuštěn 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru. Roztok byl po vychladnutí nalit do formy na přípravu gelů s hřebínkem. Po odstranění vzniklých vzduchových bublin, byl gel nechán přibližně 30 minut tuhnout. Ztuhlý gel byl přemístěn do elektroforetické vany naplněné 0,5x TBE puftrem. Do jednotlivých jamek bylo opatrně napipetováno 10  $\mu$ l vzorku smíšeného s 1  $\mu$ l glycerolu a 1  $\mu$ l Trackit Cyan/Orange Loading Buffer. Pro kontrolu velikosti vzorku byly do první jamky gelu umísťovány 4  $\mu$ l 1 kB DNA Ladder.

Vzorky byly na gel nanášeny ve standardním pořadí: DNA Ladder – negativní kontrola – pozitivní kontrola – vzorky pro 6hodinový interval – vzorky pro 24hodinový interval.

Elektroforéza byla prováděna po dobu 35 minut a napětí 100 V. Poté byl gel barven 5 minut v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1  $\mu$ g/ml a 15 minut odbarvován v deionizované vodě. Gel byl vyhodnocován pod UV lampou.



## 4 Výsledky

### 4.1 Experiment č. 1

Buněčná linie Ramos byla infikována *F. tularensis* FSC200 nebo zabitou *F. tularensis* FSC200 nebo stimulována LPS (*E. coli*) po dobu 6 a 24 hodin. Izolace RNA byla provedena pomocí TRIzol. K syntéze cDNA bylo použito 15,5 µl směsi RNA a RNase<sup>-</sup> vody, 1 µl Oligo(dt)<sub>12-18</sub> primeru a 1 µl SuperScript reverzní transkriptázy. Množství RNA použité pro syntézu cDNA je uvedeno v tabulce 5.

**Tab. 5** Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA měřené na spektrofotometru Spekol

Označení vzorku	A <sub>260</sub>	A <sub>260/280</sub>	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
K 6 a	0,2631	1,884	1,052	-
K 6 b	0,4859	2,012	1,944	1,03
K 6 c	0,4243	2,052	1,697	-
FSC 6 a	0,2757	2,232	1,103	1,82
FSC 6 b	0,1068	2,215	0,427	-
FSC 6 c	0,2153	2,210	0,861	-
Killed 6 a	0,6956	1,992	2,782	0,72
Killed 6 b	0,9637	1,943	3,855	-
Killed 6 c	0,3219	2,161	1,288	-
LPS 6 a	0,5957	2,049	2,383	0,84
LPS 6 b	0,5253	1,917	2,101	-
LPS 6 c	0,3722	2,141	1,489	-
K 24 a	0,0705	2,169	0,282	-
K 24 b	0,3157	1,815	1,263	1,58
K 24 c	0,4452	1,795	1,781	-
FSC 24 a	0,5356	2,161	2,142	0,93
FSC 24 b	0,5303	1,989	2,121	-
FSC 24 c	0,1704	2,242	0,682	-
Killed 24 a	0,1217	2,062	0,487	-

Označení vzorku	A <sub>260</sub>	A <sub>260/280</sub>	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
Killed 24 b	0,2986	1,889	1,194	-
Killed 24 c	0,6873	1,925	2,749	0,73
LPS 24 a	0,0186	1,978	0,074	-
LPS 24 b	0,4268	2,012	1,707	-
LPS 24 c	0,9129	1,974	3,652	0,55

K 6, K 24 – kontrolní buňky po 6hodinové a 24hodinové inkubaci

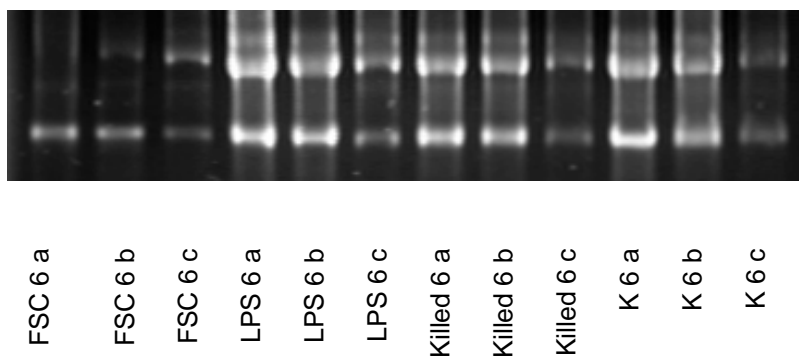
FSC 6, FSC 24 – buňky infikované *F. tularensis* FSC200 po dobu 6 a 24 hodin

Killed 6, Killed 24 – buňky infikované zabitou *F. tularensis* FSC200 po dobu 6 a 24 hodin

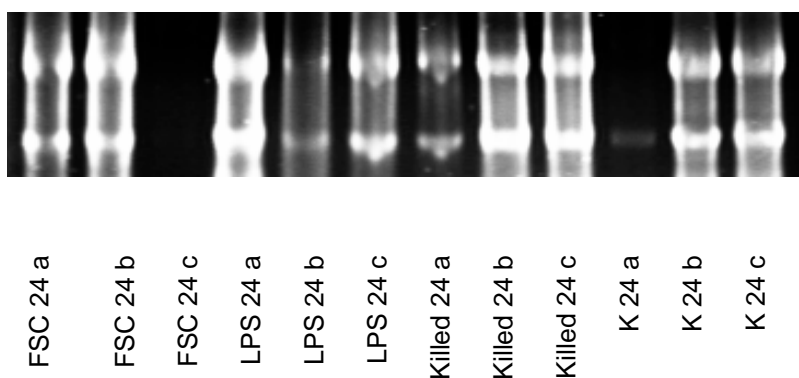
LPS 6, LPS 24 – buňky stimulované LPS po dobu 6 a 24 hodin

Kontrola kvality RNA byla zhodnocena také na 1,2% agarózovém gelu s přidavkem 10x FA pufru (Obr. 5 a 6).

**Obr. 5** Kvalita RNA po 6hodinové inkubaci



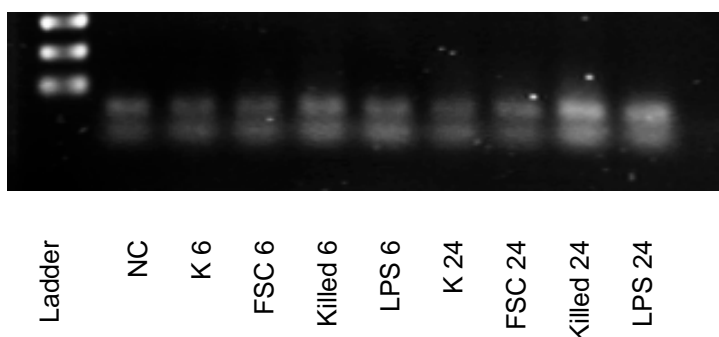
**Obr. 6** Kvalita RNA po 24hodinové inkubaci



Bylo provedeno porovnání hodnot: koncentrace RNA, jenž by měla být co nejvyšší, poměr  $A_{260/280}$ , který je pro RNA  $\sim 2,0$  a detekce na gelu, kde by měly být viditelné 2 proužky o velikosti 4,7 kbp a 1,9 kbp. Pro syntézu cDNA byly vybrány vzorky RNA, u kterých tyto porovnané hodnoty byly v optimálním poměru (Tab. 5).

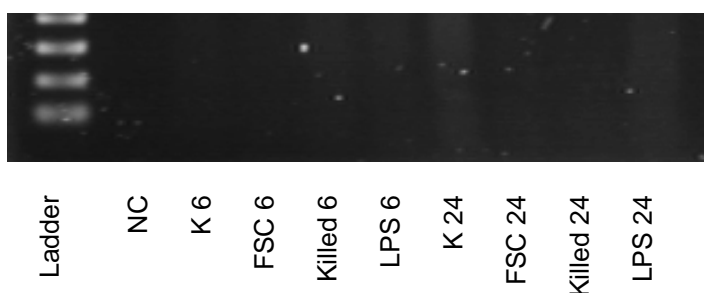
Ke standardizaci na  $\beta$ -actin (Obr. 7) byl použit 1  $\mu$ l cDNA a 24  $\mu$ l PCR mixu. Amplifikace byla provedena po dobu 28 cyklů a při teplotě „annealing“ 60°C. Jako standard byl použit 1 kB Plus DNA Ladder.

**Obr. 7** Standardizace na  $\beta$ -actin



Kvůli negativnímu výsledku byla amplifikace opakována za stejných podmínek (Obr. 8).

**Obr. 8** Standardizace na  $\beta$ -actin



Protože byl výsledek amplifikace opět negativní, byla provedena kontrola kvality primerů pro  $\beta$ -actin pomocí RT-PCR kontrolního setu (Obr. 9).

Do jedné zkumavky byl napipetován 1  $\mu$ l Total HeLa RNA, 1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primeru a 14,5  $\mu$ l RNase<sup>-</sup> vody. Do druhé zkumavky byl napipetován 0,84  $\mu$ l vzorku LPS 6, 1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primeru a 14,66  $\mu$ l RNase<sup>-</sup> vody. Směs

byla promíchána a inkubována 10 minut při 70 °C. Ke každému vzorku bylo poté přidáno 13,5 µl RT mixu:

- 6,0 µl 5x First Strand Buffer
- 3,0 µl DTT (0,1 M)
- 1,0 µl RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 U)
- 2,5 µl dNTP (10 mM)
- 1,0 µl Superscript RNase Reverse Transcriptase (400 U)

Vzorky byly inkubovány v termocykleru při teplotním profilu:

- 37 °C 60 minut
- 42 °C 30 minut
- 70 °C 5 minut
- 4 °C ∞

Vzorky pro amplifikaci byly připraveny podle tabulky 6.

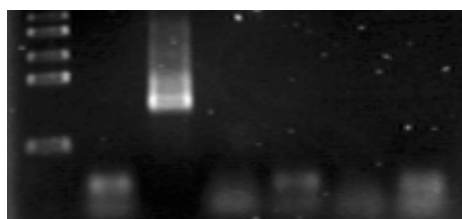
**Tab. 6** Označení vzorků a množství komponent pro kontrolu kvality primerů pro β-actin

Reakční komponenty	cDNA 1	cDNA 2	cDNA 3	cDNA 4	NC 1	NC 2
RNase <sup>-</sup> voda (µl)	14	14	14	14	15	15
PCR Rxn pufr (µl)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl <sub>2</sub> (µl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1
β-actin Sense Primer (µl)	-	1	-	1	-	1
β-actin Antisense Primer (µl)	-	1	-	1	-	1
Control Sense Primer (µl)	1	-	1	-	1	-
Control Antisense Primer (µl)	1	-	1	-	1	-
Taq DNA polymeráza (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
cDNA - HeLa (µl)	1	1	-	-	-	-
cDNA - LPS 6 (µl)	-	-	1	1	-	-

Vzorky byly promíchány a inkubovány v termocykleru podle uvedeného teplotního profilu, kroky 2-4 byly opakovány 40krát:

94 °C	5 minut
94 °C	15 sekund
55 °C	30 sekund
72 °C	1 minuta
72 °C	5 minut
4 °C	∞

**Obr. 9** Kontrola kvality primerů pro  $\beta$ -actin



Ladder  
NC 1  
cDNA 1  
cDNA 2  
cDNA 3  
NC 2  
cDNA 4

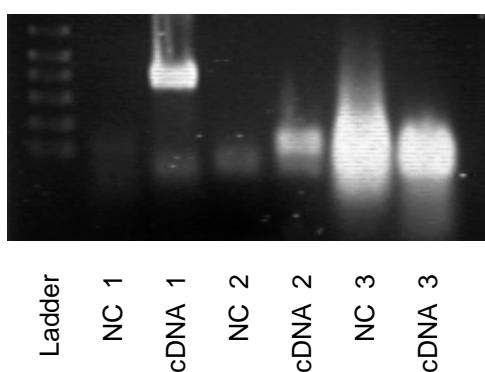
Protože byla reakce pozitivní jen u vzorku cDNA, u kterého byla použita kontrolní HeLa RNA a kontrolní primery pro  $\beta$ -actin, byly objednány nové primery pro  $\beta_2$ -microglobulin. Kontrola kvality primerů pro  $\beta$ -actin pomocí RT-PCR kontrolního setu byla opakována společně s novými primery pro  $\beta_2$ -microglobulin (Obr. 10).

Do zkumavek byl napipetován 1  $\mu$ l Total HeLa RNA, 1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primeru a 14,5  $\mu$ l RNase<sup>-</sup> vody. Směs byla promíchána a inkubována 10 minut při 70 °C. Ke vzorkům bylo přidáno 13,5  $\mu$ l RT mixu, byly promíchány a inkubovány v termocykleru 37 °C 60 minut, 42 °C 30 minut a 70 °C 5 minut.

Vzorky pro amplifikaci byly připraveny podle tabulky 7. Amplifikace probíhala za stejných podmínek jako v předchozí reakci.

**Tab. 7** Označení vzorků a množství komponent pro kontrolu kvality primerů pro  $\beta$ -actin

Reakční komponenty	cDNA 1	cDNA 2	cDNA 3	NC 1	NC 2	NC 3
RNase <sup>-</sup> voda ( $\mu$ l)	14	14	14	14	15	15
PCR Rxn pufr ( $\mu$ l)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl <sub>2</sub> ( $\mu$ l)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP ( $\mu$ l)	1	1	1	1	1	1
$\beta$ -actin Sense Primer ( $\mu$ l)	-	-	1	-	-	1
$\beta$ -actin Antisense Primer ( $\mu$ l)	-	-	1	-	-	1
$\beta_2$ -microglobulin Sense Primer ( $\mu$ l)	-	1	-	-	1	-
$\beta_2$ -microglobulin Antisense Primer ( $\mu$ l)	-	1	-	-	1	-
Control Sense Primer ( $\mu$ l)	1	-	1	1	-	-
Control Antisense Primer ( $\mu$ l)	1	-	1	1	-	-
Taq DNA polymeráza ( $\mu$ l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
cDNA - HeLa ( $\mu$ l)	1	1	1	-	-	-

**Obr. 10** Kontrola kvality primerů pro  $\beta$ -actin a  $\beta_2$ -microglobulin

Vzhledem k negativním výsledkům amplifikace tam, kde byl použit primer pro  $\beta$ -actin (na gelu byly viditelné pouze dimery primerů), byl v dalších reakcích pro standardizaci exprese genů jednotlivých vzorků cDNA používán primer pro  $\beta_2$ -microglobulin (Obr. 11).

Vzorky pro amplifikaci genů pro  $\beta_2$ -microglobulin byly připraveny podle tabulky 8. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu$ l.

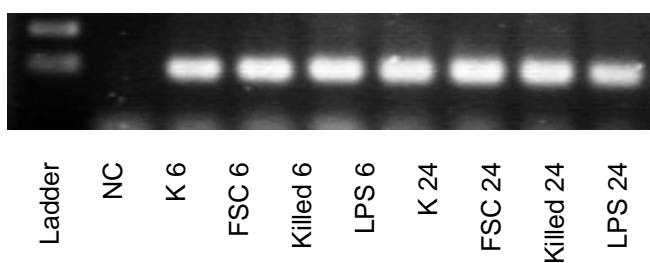
**Tab. 8** Množství komponent pro přípravu PCR mixu pro standardizaci na  $\beta_2$ -microglobulin

Reakční komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství ( $\mu$ l)
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	19,25
PCR Rxn Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1
dNTP mix	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
$\beta_2$ -microglobulin Sense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
$\beta_2$ -microglobulin Antisense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1,25 units	0,25
cDNA	-	-	1

Amplifikace probíhala v termocycleru při uvedeném teplotním profilu, kroky 2 a 3 byly opakovány 28krát:

95 °C	5 minut
95 °C	10 sekund
60 °C	40 sekund
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

**Obr. 11** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin



Byla také provedena opětovná kontrola kvality RNA pomocí spektrofotometru NanoPhotometer (Tab. 9)

**Tab. 9** Kontrola kvality RNA a koncentrace RNA měřené na spektrofotometru NanoPhotometer

Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA (µg/µl)
K 6 a	1,91	0,52	0,867
K 6 b	1,71	0,33	1,270
K 6 c	1,62	0,21	0,795
FSC 6 a	1,64	0,23	0,893
FSC 6 b	1,85	0,57	0,271
FSC 6 c	1,61	0,21	0,741
Killed 6 a	1,84	0,50	1,472
Killed 6 b	1,59	0,23	0,777
Killed 6 c	1,64	0,31	1,244
LPS 6 a	1,68	0,32	1,181
LPS 6 b	1,86	0,80	0,357
LPS 6 c	1,65	0,37	1,459
K 24 a	1,76	0,39	0,236
K 24 b	1,93	0,61	0,572
K 24 c	1,89	0,42	0,766
FSC 24 a	1,64	0,40	1,466
FSC 24 b	1,69	0,29	1,026
FSC 24 c	1,56	0,18	0,649
Killed 24 a	1,88	0,75	0,424
Killed 24 b	1,72	0,35	1,283
Killed 24 c	1,71	0,34	1,252
LPS 24 a	1,83	0,51	1,284
LPS 24 b	1,66	0,33	1,217
LPS 24 c	1,67	0,34	1,300



---

Hodnota podílu absorbance  $A_{260/280}$  by měla být pro čistou RNA okolo 2,0. Na novém přístroji NanoPhotometer byla však naměřena hodnota podílu absorbance  $A_{260/280}$  nižší. Snížení bylo zřejmě důsledkem vysoké absorbance vzorku při 280 nm. To mohlo být způsobeno přítomností proteinů nebo aromatických látek např. fenolu ve vzorcích. Fenol absorbuje při 270 a 230 nm. Dalšími látkami, které absorbují při 230 nm jsou např. sacharidy, EDTA nebo močovina. Správná hodnota podílu  $A_{260/230}$  pro nukleové kyseliny je 2,0 - 2,2. Vzhledem k tomu, že vzorky RNA byly izolovány pomocí TRIzol, což je fenolický roztok, nasvědčovala velmi nízká hodnota  $A_{260/230}$  právě na přítomnost fenolu. Ten mohl negativně ovlivňovat další kroky RT-PCR. Proto byla v dalším experimentu provedena izolace RNA pomocí TRIzol a RNeasy Mini Kit a porovnány výsledné poměry absorbancí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  a výtěžnost.<sup>54</sup>

## 4.2 Experiment č. 2

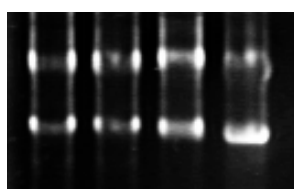
Byla připravena suspenze buněčné linie Ramos. Izolace RNA byla provedena pomocí TRIzol a RNeasy Mini Kit. K syntéze cDNA bylo použito 15  $\mu\text{l}$  směsi RNA a RNase<sup>-</sup> vody, 1  $\mu\text{l}$  Oligo(dt)<sub>12-18</sub> primeru a 1  $\mu\text{l}$  SuperScript reverzní transkriptázy. Množství RNA v  $\mu\text{l}$  pro syntézu cDNA je uvedeno v tabulce 10.

**Tab. 10** Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Množství RNA pro syntézu cDNA ( $\mu\text{l}$ )
TRIzol 1	1,92	0,68	1,651	1,21
TRIzol 2	1,93	0,97	2,023	0,99
Kit 1	2,05	1,73	0,774	2,58
Kit 2	2,06	1,28	1,086	1,84

Kontrola kvality RNA byla zhodnocena také na 1,2% agarózovém gelu s přidavkem 10x FA pufru (Obr. 12)

**Obr. 12** Kvalita RNA

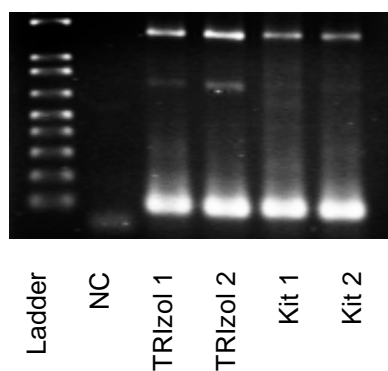


TRIzol 1  
TRIzol 2  
Kit 1  
Kit 2

Hodnota podílu absorbance A<sub>260/230</sub> byla u vzorků RNA izolovaných pomocí TRIzol téměř o polovinu nižší ve srovnání se vzorky RNA izolovaných pomocí RNeasy Mini Kit. I A<sub>260/280</sub> byla u vzorků RNA izolovaných pomocí TRIzol nižší oproti vzorkům RNA izolovaných pomocí RNeasy Mini Kit. Metoda izolace RNA pomocí TRIzol má sice vyšší výtěžnost, ale vzhledem k výše uvedeným negativním vlivům, bude prováděna izolace RNA v dalších experimentech pomocí RNeasy Mini Kit.

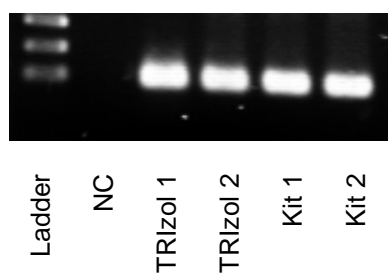
K amplifikaci genu pro  $\beta_2$ -microglobulin (Obr. 13) byl použit 1  $\mu$ l cDNA a 24  $\mu$ l PCR mixu. Amplifikace probíhala po dobu 28 cyklů při teplotě „annealing“ 60°C. Jako standard byl použit 1 kB Plus DNA Ladder.

**Obr. 13** Detekce  $\beta_2$ -microglobulinu



Vzhledem k nespecifickým reakcím byla opakována amplifikace genu pro  $\beta_2$ -microglobulin za stejných podmínek (Obr. 14).

**Obr. 14** Detekce  $\beta_2$ -microglobulinu



### 4.3 Experiment č. 3

Buněčná linie Ramos byla infikována *F. tularensis* FSC200 nebo zabitou *F. tularensis* FSC200 nebo stimulována LPS (*E. coli*) po dobu 6 a 24 hodin. Izolace RNA byla provedena pomocí RNeasy Mini Kit. K syntéze cDNA bylo použito 15 µl směsi RNA a RNase<sup>-</sup> vody a 1,5 µl Oligo T18VN primeru a 1 µl SuperScript reverzní transkriptázy. Množství RNA pro syntézu cDNA je uvedeno v tabulce 11.

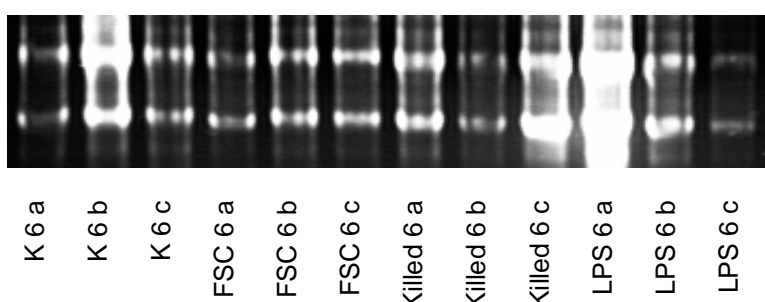
**Tab. 11** Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
K 6 a	2,06	1,75	2,122	-
K 6 b	2,05	1,34	1,578	-
K 6 c	2,05	1,92	1,749	1,14
FSC 6 a	2,06	0,71	1,621	-
FSC 6 b	2,06	1,79	1,668	-
FSC 6 c	2,05	1,76	1,803	1,11
Killed 6 a	2,06	1,13	1,561	1,28
Killed 6 b	2,06	1,29	1,781	-
Killed 6 c	2,07	1,13	1,310	-
LPS 6 a	2,05	1,84	2,106	0,95
LPS 6 b	2,05	1,34	1,764	-
LPS 6 c	2,06	1,46	1,426	-
K 24 a	2,04	1,77	1,779	1,12
K 24 b	2,06	1,25	1,650	-
K 24 c	2,06	0,65	1,301	-
FSC 24 a	2,05	1,02	1,226	-
FSC 24 b	2,05	1,96	1,638	-
FSC 24 c	2,06	1,66	1,688	1,19
Killed 24 a	2,12	0,45	0,928	-
Killed 24 b	2,06	1,86	1,262	1,59
Killed 24 c	2,06	2,00	1,018	-

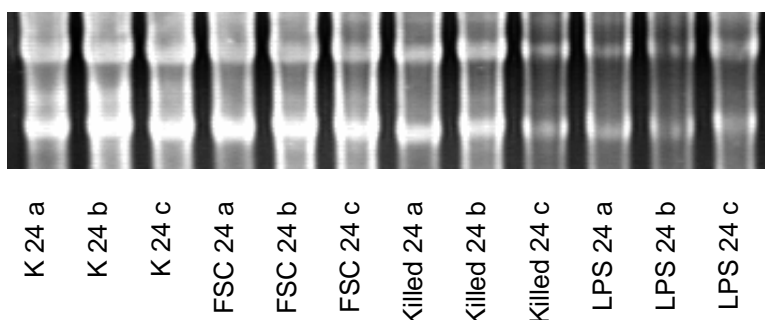
Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA (µg/µl)	Množství RNA pro syntézu cDNA (µl)
LPS 24 a	2,06	0,88	1,315	-
LPS 24 b	2,07	1,70	1,459	-
LPS 24 c	2,06	2,03	1,656	1,21

Kontrola kvality RNA byla zhodnocena také na 1,2% agarózovém gelu s přidavkem 10x FA pufru (Obr. 15 a 16).

**Obr. 15** Kvalita RNA po 6hodinové inkubaci

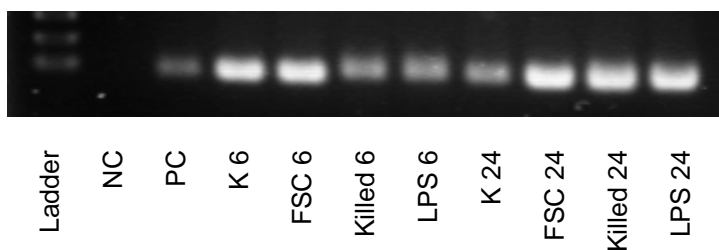


**Obr. 16** Kvalita RNA po 24hodinové inkubaci

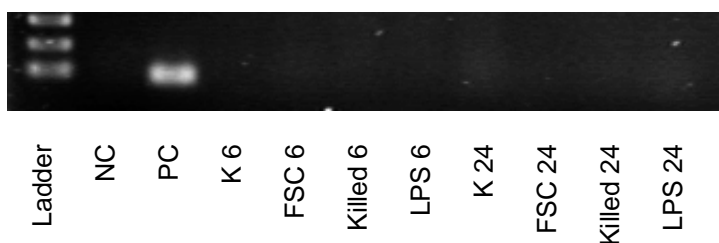


Bylo provedeno porovnání hodnot: koncentrace RNA, poměr A<sub>260/280</sub>, poměr A<sub>260/230</sub> a detekce na gelu. Pro syntézu cDNA byly vybrány vzorky RNA, u kterých tyto porovnané hodnoty byly v optimálním poměru (Tab. 11).

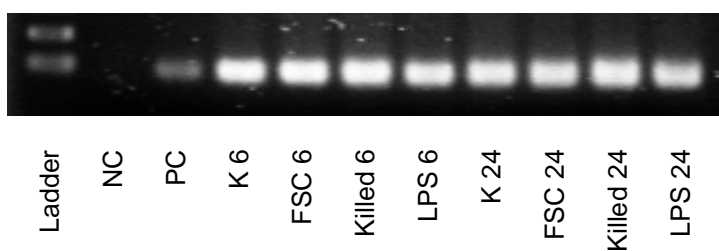
Ke standardizaci na β<sub>2</sub>-microglobulin (Obr. 17) byl použit 1 µl cDNA a 24 µl PCR mixu. Pozitivní kontrola byla připravena tisícinásobným zředěním ze vzorku pozitivního při předchozí amplifikaci. Bylo amplifikováno po dobu 28 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C. Jako standard byly použity 1 kB Plus DNA Ladder.

**Obr. 17** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin

Protože u vzorků Killed 6, LPS 6 a K 24 byly detekované proužky slabší intenzity, bylo upraveno množství cDNA použité pro amplifikaci na 2  $\mu$ l (Obr. 18). Amplifikace probíhala po dobu 28 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C.

**Obr. 18** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin

Kvůli negativnímu výsledku byla amplifikace zopakována (Obr. 19).

**Obr. 19** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin

Amplifikace dalších genů byla prováděna s množstvím cDNA, RNase<sup>-</sup> vody a PCR mixu uvedeném v tabulce 12.

**Tab. 12** Množství cDNA, RNase<sup>-</sup> vody a PCR mixu pro amplifikaci genů

Označení vzorku	Množství cDNA (μl)	Množství RNase <sup>-</sup> vody (μl)	Množství PCR mixu (μl)
K 6	1	4	20
FSC 6	1	4	20
Killed 6	2	3	20
LPS 6	2	3	20
K 24	2	3	20
FSC 24	1	4	20
Killed 24	1	4	20
LPS 24	1	4	20

PCR mix o objemu 20 μl byl připraven podle protokolu uvedeném v tabulce 13.

**Tab. 13** Množství komponent pro přípravu PCR mixu

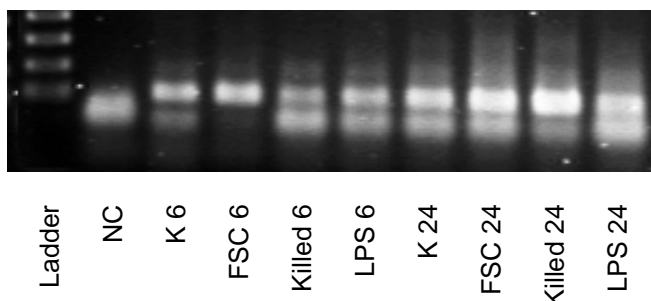
Reakční komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství (μl)
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	15,25
PCR Rxn Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP mix	10 mM	200 μM	0,5
Sense Primer	100 μM	1 μM	0,25
Antisense Primer	100 μM	1 μM	0,25
Taq DNA polymeráza	5 U/μl	2,5 U	0,5

Amplifikace probíhala v termocyleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2-4 byly opakovány 33krát:

95 °C	5 minut
95 °C	10 sekund
60 °C	40 sekund
72 °C	45 sekund
72 °C	5 minut
4 °C	∞

Gen pro IFN- $\beta$  byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 20).

**Obr. 20** Detekce IFN- $\beta$



Vzhledem k nespecifickým reakcím byla pro primery pro IFN- $\beta$  provedena optimalizace koncentrace  $MgCl_2$  a dNTP (Obr. 21). K amplifikaci byl použit 1  $\mu$ l vzorku K 6 a množství  $MgCl_2$  a dNTP podle tabulky 14 a 15. Amplifikace probíhala při 33 cyklech a teplotě „annealing“ 60 °C.

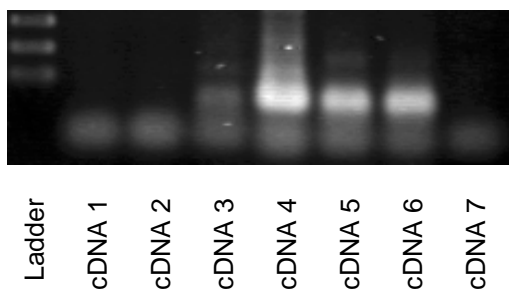
**Tab. 14** Výsledná koncentrace  $MgCl_2$ , množství  $MgCl_2$  a RNase<sup>-</sup> vody použité pro amplifikaci

Označení vzorku	Výsledná koncentrace $MgCl_2$ (mM)	Množství $MgCl_2$ ( $\mu$ l)	Množství RNase <sup>-</sup> vody ( $\mu$ l)
cDNA 1	0,5	0,2	11,3
cDNA 2	1	0,4	11,1
cDNA 3	2	0,8	10,7
cDNA 4	5	2	9,5

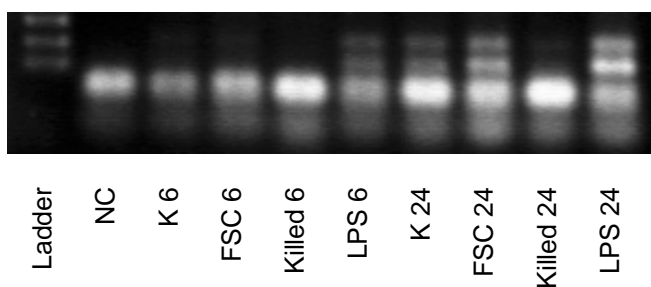
**Tab 15** Výsledná koncentrace dNTP, množství dNTP a RNase<sup>-</sup> vody použité pro amplifikaci

Označení vzorku	Výsledná koncentrace dNTP ( $\mu$ M)	Množství dNTP ( $\mu$ l)	Množství RNase <sup>-</sup> vody ( $\mu$ l)
cDNA 5	50	0,1	11,4
cDNA 6	200	0,4	11,1
cDNA 7	500	1	10,5

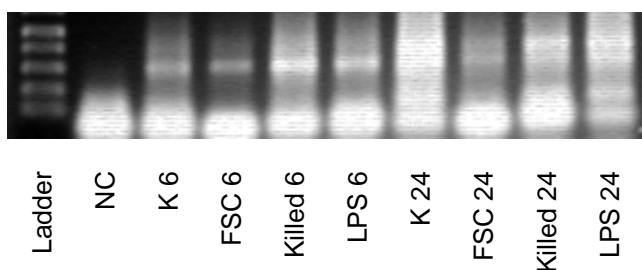


**Obr. 21** Detekce IFN- $\beta$ 

Kvůli negativnímu výsledku po optimalizaci koncentrace  $MgCl_2$  a dNTP byl gen pro IFN- $\beta$  amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C (Obr. 22).

**Obr. 22** Detekce IFN- $\beta$ 

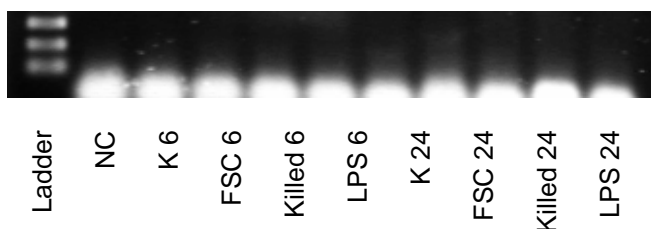
Po amplifikaci byly viditelné slabé proužky u některých vzorků, proto byl gen pro IFN- $\beta$  amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C a množství cDNA přidávané do reakce bylo zvýšeno na dvojnásobek (Obr. 23).

**Obr. 23** Detekce IFN- $\beta$ 

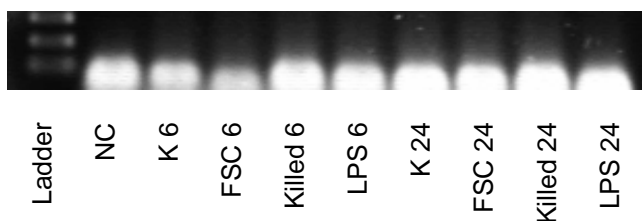
Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro IFN- $\beta$  amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C, množství cDNA bylo stejné jako v předchozí reakci a množství Taq DNA polymerázy bylo sníženo na 0,2  $\mu$ l (Obr. 24).

**Obr. 24** Detekce IFN- $\beta$ 

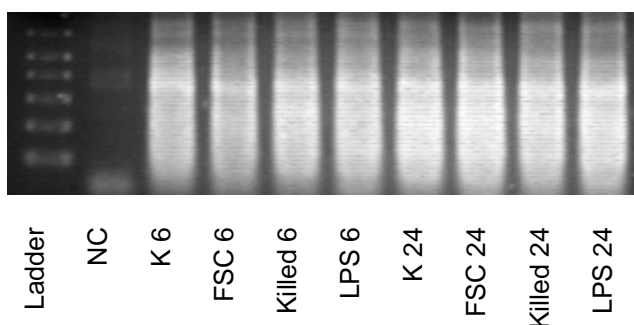
Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro IFN- $\beta$ . Gen pro TNF- $\alpha$  byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 25).

**Obr. 25** Detekce TNF- $\alpha$ 

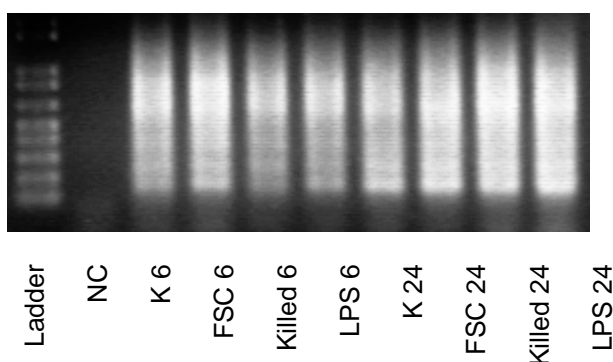
Kvůli negativnímu výsledku byl gen pro TNF- $\alpha$  amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C (Obr. 26).

**Obr. 26** Detekce TNF- $\alpha$ 

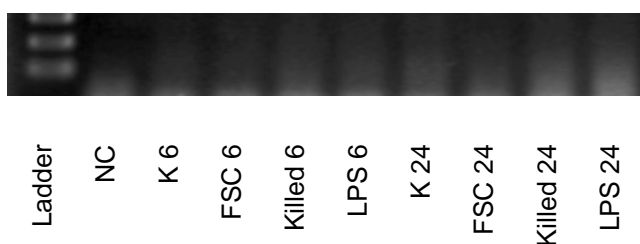
Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro TNF- $\alpha$ . Gen pro TNFR-NF $\kappa$ B byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 27).

**Obr. 27** Detekce TNFR-NFκB

Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro TNFR-NFκB amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C a množství Taq DNA polymerázy bylo sníženo na 0,2 μl (Obr. 28).

**Obr. 28** Detekce TNFR-NFκB

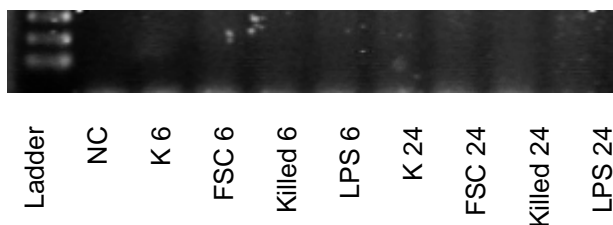
Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro TNFR-NFκB. Gen pro IL-1β byl amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 29).

**Obr. 29** Detekce IL-1β

Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro IL-1β.

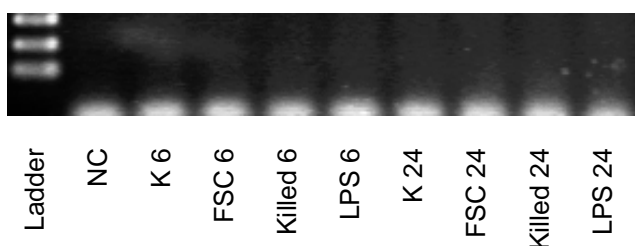
Gen pro IRF-3 byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 30).

**Obr. 30** Detekce IRF-3



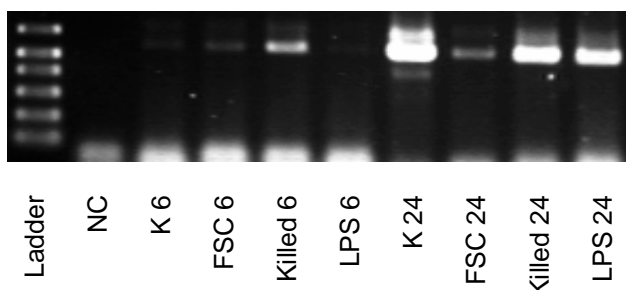
Kvůli negativnímu výsledku byl gen pro IRF-3 amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C (Obr. 31).

**Obr. 31** Detekce IRF-3

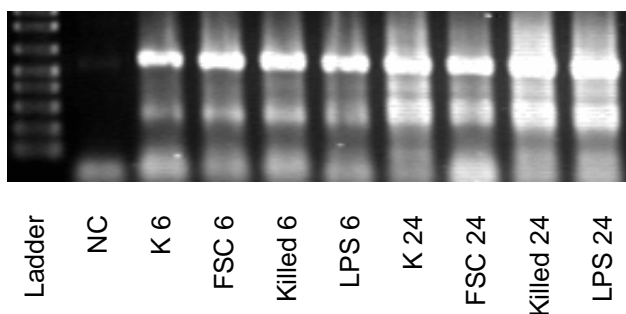


Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro IRF-3. Gen pro IP-10 byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 32).

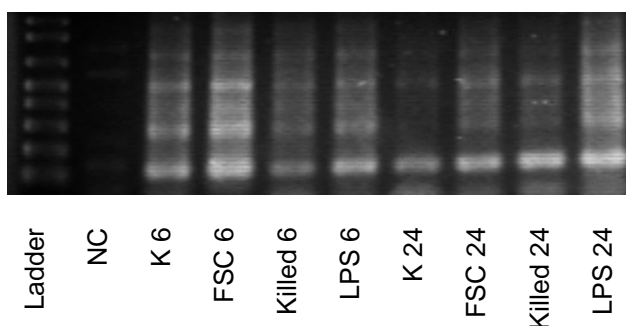
**Obr. 32** Detekce IP-10



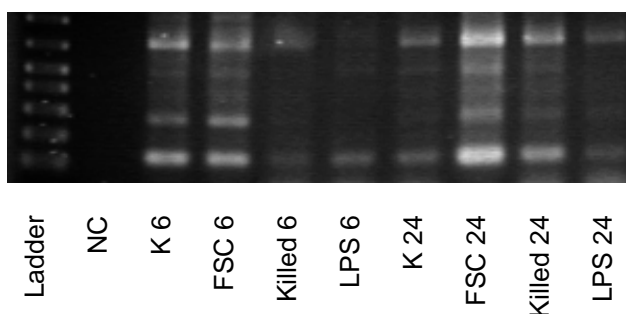
Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro IP-10 amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 55 °C (Obr. 33).

**Obr. 33** Detekce IP-10

Vzhledem k nespecifickým reakcím nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro IP-10. Gen pro TLR-8 byl amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 34).

**Obr. 34** Detekce TLR-8

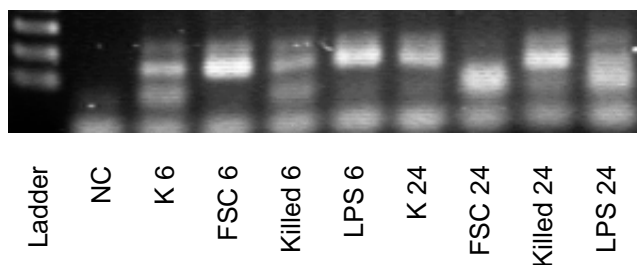
Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro TLR-8 amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C a množství Taq polymerázy bylo sníženo na 0,2 µl (Obr. 35).

**Obr. 35** Detekce TLR-8

Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro TLR-8.

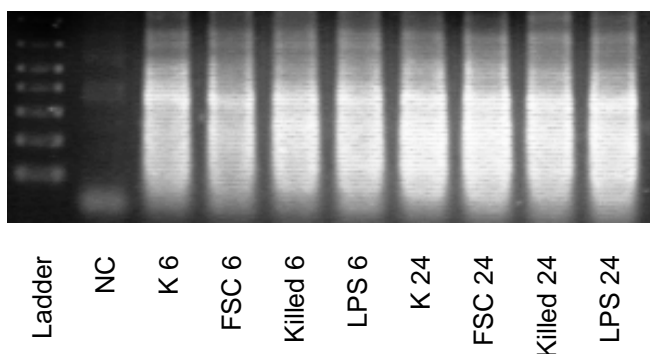
Gen pro TNFR-CD40 byl amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 36).

**Obr. 36** Detekce TNFR-CD40



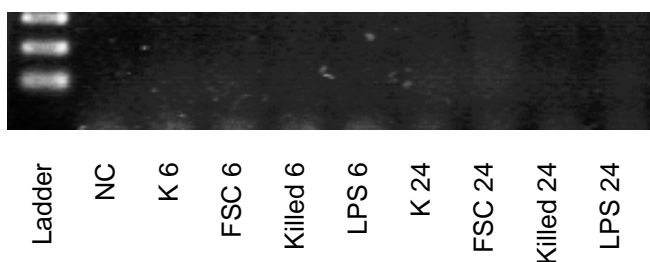
Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro TNFR-CD40. Gen pro IL-8 byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 37).

**Obr. 37** Detekce IL-8



Amplifikace byla opakována při teplotě „annealing“ 60 °C a 33 cyklech a množství přidané Taq polymerázy bylo sníženo na 0,2 µl (Obr. 38).

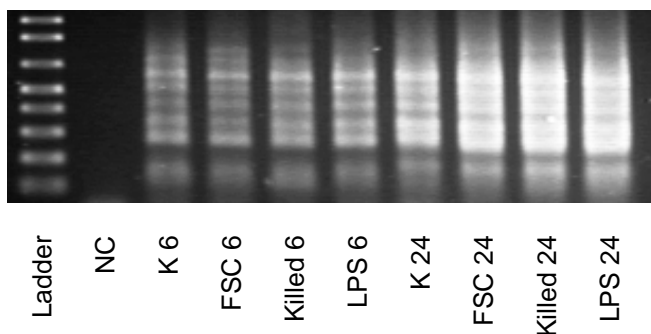
**Obr. 38** Detekce IL-8



Vzhledem k negativnímu výsledku nebylo dále pokračováno v detekci exprese genu pro IL-8.

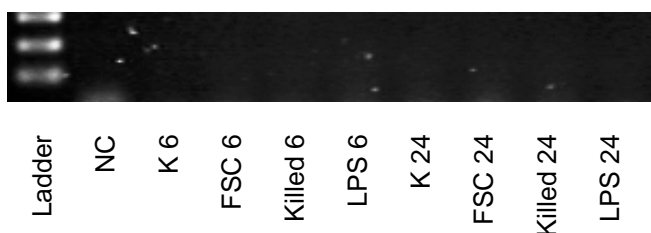
Gen pro IFN- $\gamma$  byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 39).

**Obr. 39** Detekce IFN- $\gamma$



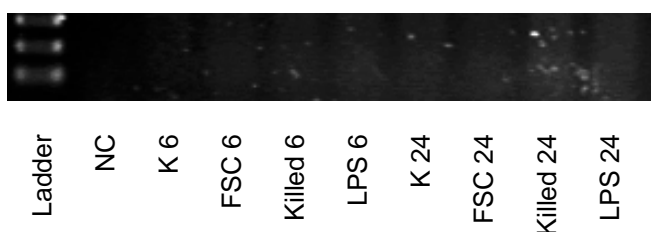
Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro IFN- $\gamma$  amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C a množství Taq polymerázy přidané do reakce bylo sníženo na 0,2  $\mu$ l (Obr. 40).

**Obr. 40** Detekce IFN- $\gamma$



Kvůli negativnímu výsledku byla pro amplifikaci změněna teplota „annealing“ na 55 °C (Obr. 41).

**Obr. 41** Detekce IFN- $\gamma$



Protože detekce genové exprese B buněk byla negativní nebo byly přítomny nespecifické reakce, byly pro další experiment připraveny pouze vzorky s kontrolními buňkami a stimulované LPS (*E. coli*) pro optimalizaci primerů.

#### 4.4 Experiment č. 4

Buněčná linie Ramos byla stimulována LPS (*E. coli*) po dobu 24 hodin. Izolace RNA byla provedena pomocí RNeasy Mini Kit. K syntéze cDNA bylo použito 15  $\mu$ l směsi RNA a RNase<sup>-</sup> vody a 1,5  $\mu$ l Oligo T18VN primeru a 1  $\mu$ l M-MLV reverzní transkriptázy. Množství RNA pro syntézu cDNA je uvedeno v tabulce 16.

**Tab. 16** Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

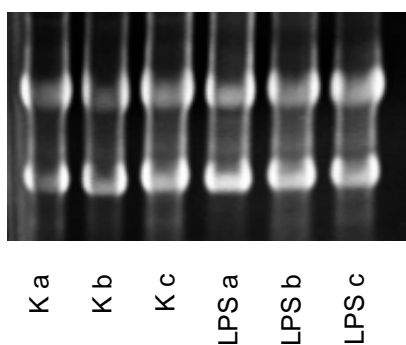
Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	Množství RNA pro syntézu cDNA ( $\mu$ l)
K 24 a	1,74	1,31	0,892	2,24
K 24 b	1,88	0,89	0,794	2,52
K 24 c	1,64	1,54	0,990	2,02
LPS 24 a	1,85	0,98	0,939	2,13
LPS 24 b	1,68	1,36	0,959	2,09
LPS 24 c	1,71	1,67	0,866	2,31

K 24 – kontrolní buňky po 24hodinové inkubaci

LPS 24 – buňky stimulované LPS po dobu 24 hodin

Kontrola kvality RNA byla zhodnocena také na 1,2% agarózovém gelu s přidavkem 10x FA pufru (Obr. 42).

**Obr. 42** Kvalita RNA





Byly změněny podmínky syntézy cDNA. Celkový objem pro syntézu cDNA byl 20  $\mu\text{l}$ . Ke směsi vzorku RNA a RNase<sup>-</sup> vody o celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$  byl přidán 1  $\mu\text{l}$  Oligo T18VN primeru a 1  $\mu\text{l}$  dNTPmixu. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 65 °C v termocycleru. Poté byly přidány 4  $\mu\text{l}$  5x First Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT a 1  $\mu\text{l}$  RNaseOUT. Směs byla inkubována 2 minuty při 37 °C. Nakonec byl přidán 1  $\mu\text{l}$  M-MLV reverzní transkriptázy a inkubováno 50 minut při 37 °C a 15 minut při 70 °C.

Vzorky pro amplifikaci byly připraveny podle tabulky 17. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu\text{l}$ .

**Tab. 17** Množství komponent pro přípravu PCR mixu

Komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství ( $\mu\text{l}$ )
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	19,25
PCR Rxn Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1
dNTP mix	10 mM	200 $\mu\text{M}$	0,5
Primer Sense	100 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,25
Primer Antisense	100 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,25
Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu\text{l}$	1,25 units	0,25
cDNA	-	-	1

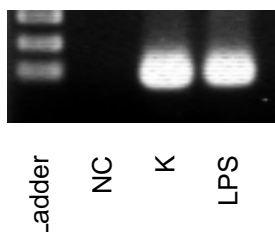
Vzorky byly inkubovány v termocycleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2 a 3 byly opakovány 33krát:

95 °C	5 minut
95 °C	10 sekund
60 °C	40 sekund
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

Pro lepší rozdělení amplifikačních produktů byl pro elektroforézu použit 2% agarózový gel. Pro přípravu 2% agarózového gelu byly rozpuštěny 2 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufu.

Ke standardizaci na  $\beta_2$ -microglobulin (Obr. 43) byl použit 1  $\mu$ l cDNA a 24  $\mu$ l PCR mixu. Bylo amplifikováno po dobu 28 cyklů při teplotě „annealing“ 60°C. Jako standard byl použit 1 kB Plus DNA Ladder.

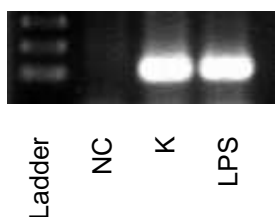
**Obr. 43** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin



V důsledku nedostatku 1 kB Plus DNA Ladder, nebyl u některých vzorků použit jako kontrola velikosti amplifikačních produktů.

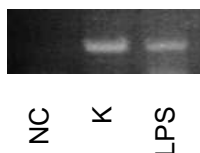
Gen pro IRF-3 byl amplifikován po dobu 33 cyklů při teplotě „annealing“ 50 °C (Obr. 44).

**Obr. 44** Detekce IRF-3

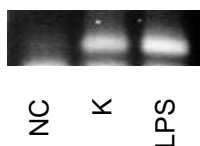


Gen pro IFN- $\beta$  byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 56, 55, 54, 53 a 57 °C. Optimální teplota pro primery pro IFN- $\beta$  byla 57 °C (Obr. 45).

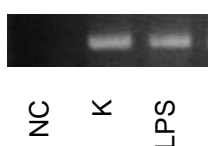
**Obr. 45** Detekce IFN- $\beta$



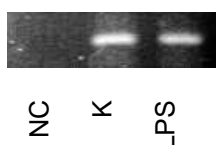
Gen pro TGF- $\beta$  byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 66, 65, 60, 67 a 68 °C. Optimální teplota pro primery pro TGF- $\beta$  byla 68 °C (Obr. 46).

**Obr. 46** Detekce TGF- $\beta$ 

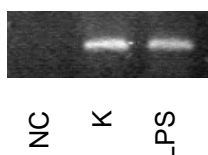
Gen pro TNFR-CD40 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 54, 55, 56 a 57 °C. Optimální teplota pro primery pro TNFR-CD40 byla 57 °C (Obr. 47).

**Obr. 47** Detekce TNFR-CD40

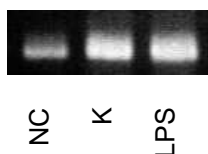
Gen pro TLR-8 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 50, 51, 52 a 53 °C. Optimální teplota pro primery pro TLR8 byla 53 °C (Obr. 48).

**Obr. 48** Detekce TLR-8

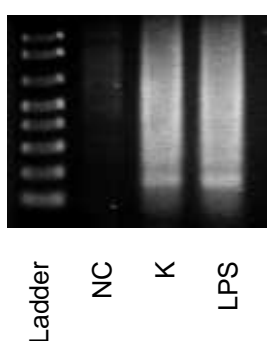
Gen pro GM-CSF byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 63, 62 a 61 °C. Optimální teplota pro primery pro GM-CSF byla 61 °C (Obr. 49).

**Obr. 49** Detekce GM-CSF

Gen pro TLR-7 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 50, 51, 52, 53, 54 a 56 °C (Obr. 50). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 50** Detekce TLR-7 (teplota „annealing“ 56 °C)

Gen pro TNFR-NFκB byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 54 (Obr. 51), 53, 52, 51, 50, 49 a 46 °C.

**Obr. 51** Detekce TNFR-NFκB (teplota „annealing“ 54 °C)

Kvůli nescifickým reakcím byla pro primery pro TNFR-NFκB provedena optimalizace koncentrace MgCl<sub>2</sub> (Obr. 52 a 53). K amplifikaci byl použit 1 μl vzorku a množství MgCl<sub>2</sub> podle tabulky 18. Amplifikace probíhala po dobu 33 cyklů a teplotě „annealing“ 50 °C.

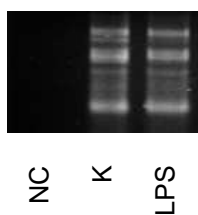
**Tab. 18** Výsledná koncentrace MgCl<sub>2</sub>, množství MgCl<sub>2</sub> a RNase<sup>-</sup> vody použité pro amplifikaci

Označení vzorků	Výsledná koncentrace MgCl <sub>2</sub> (mM)	Množství MgCl <sub>2</sub> (μl)	Množství RNase <sup>-</sup> vody (μl)
cDNA 1	1,5	0,75	19,5
cDNA 2	2	1	19,25
cDNA 3	2,5	1,25	19
cDNA 4	3	1,5	18,75
cDNA 5	3,5	1,75	18,5
cDNA 6	4	2	18,25
cDNA 7	4,5	2,25	18,
cDNA 8	5	2,5	17,75

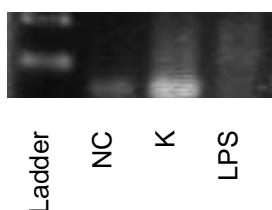
**Obr. 52** Detekce TNFR-NFκB**Obr. 53** Detekce TNFR-NFκB

Vzhledem k negativnímu výsledku po optimalizaci koncentrace  $MgCl_2$  nebylo pokračováno v optimalizaci primerů pro TNFR-NFκB.

Gen pro IL-8 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 55, 54, 53, 52, 51 a 50 °C (Obr. 54). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

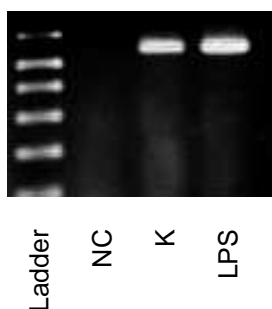
**Obr. 54** Detekce IL-8 (teplota „annealing“ 50 °C)

Gen pro IL-1β byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 55, 56 a 60 °C (Obr. 55). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 55** Detekce IL-1β (teplota „annealing“ 60 °C)

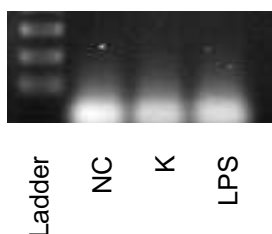
Gen pro IP-10 byl nejprve amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 60, 50 a 55 °C (Obr. 56). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat. Amplikony, které byly pozorovány na gelu, totiž velikostí neodpovídají očekávaným produktům.

**Obr. 56** Detekce IP-10 (teplota „annealing“ 55 °C)



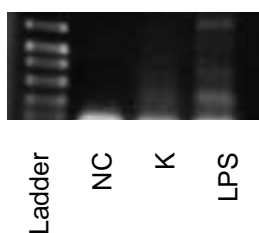
Gen pro TNF- $\alpha$  byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 65 a 60 °C (Obr. 57). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 57** Detekce TNF- $\alpha$  (teplota „annealing“ 60 °C)



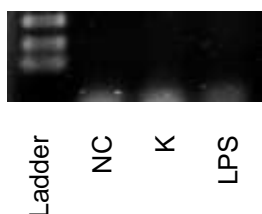
Gen pro IL-2 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 65, 64, 62, 60 a 58 °C (Obr. 58). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 58** Detekce IL-2 (teplota „annealing“ 58 °C)



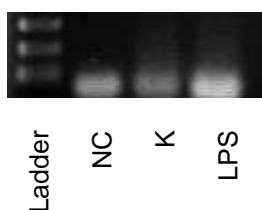
Gen pro IL-4 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 63, 60, 59 a 58 °C (Obr. 59). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 59** Detekce IL-4 (teplota „annealing“ 58 °C)



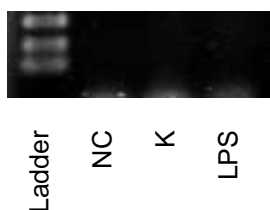
Gen pro IL-6 byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 60, 59 a 55 °C (Obr. 60). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 60** Detekce IL-6 (teplota „annealing“ 55 °C)



Gen pro IFN- $\gamma$  byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 55, 50, 47, 46 a 45 °C (Obr. 61). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 61** Detekce IFN- $\gamma$  (teplota „annealing“ 45 °C)



Podařilo se zoptimalizovat pouze primery pro tyto geny: IRF-3, IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNFR-CD40, TLR8 a GM-CSF. V optimalizaci dalších primerů se nepokračovalo, protože primery byly nově navrženy v programu „LightCycler Probe Design“ a nebyla ověřena jejich funkčnost.

Byly objednány nové primery (pojmenované II) pro  $\beta_2$ -microglobulin II, IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II, IL-12 II a IL-15 II, jejich funkčnost byla už prokázána.<sup>55</sup> I pro tyto primery bylo však nutné provést optimalizaci pro námi používanou buněčnou linii.

Vzorky ke standardizaci na  $\beta_2$ -microglobulin II byly připraveny podle tabulky 19. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu$ l.

**Tab. 19** Množství komponent pro přípravu PCR mixu

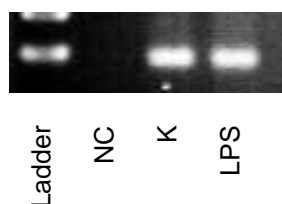
Reakční komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství ( $\mu$ l)
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	17,75
TrueStart Taq Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5 mM	2,5
dNTP mix	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
$\beta_2$ -microglobulin II Sense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
$\beta_2$ -microglobulin II Antisense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
TrueStart Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1,25 units	0,25
cDNA	-	-	1

Vzorky byly inkubovány v termocycleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2 a 3 byly opakovány 28krát:

95 °C	5 minut
95 °C	10 sekund
60 °C	40 sekund
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

Ke standardizaci na  $\beta_2$ -microglobulin II (Obr. 62) byl použit 1  $\mu$ l cDNA a 24  $\mu$ l PCR mixu. Amplifikace proběhla po dobu 28 cyklů při teplotě „annealing“ 60°C. Jako standard byly použity 3  $\mu$ l pUC Mix Marker.



**Obr. 62** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin II

Vzorky pro amplifikaci genů pro IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II, IL-12 II a IL-15 II byly připraveny podle tabulky 20. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu$ l.

**Tab. 20** Množství komponent pro přípravu PCR mixu

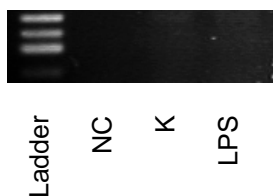
Komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství ( $\mu$ l)
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	19,25
TrueStart Taq Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1
dNTP mix	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
Sense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
Antisense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
TrueStart Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1,25 units	0,25
cDNA	-	-	1

Vzorky byly inkubovány v termocycleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2 a 3 byly opakovány 40krát:

95 °C	10 minut
95 °C	15 sekund
60 °C	1 minuta
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

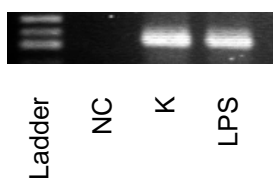
Gen pro IFN- $\gamma$  II byl nejprve amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 63)

**Obr. 63** Detekce IFN- $\gamma$  II



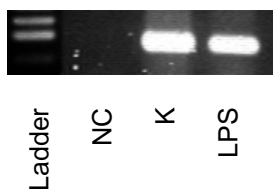
Kvůli negativnímu výsledku byla amplifikace zopakována. (Obr. 64).

**Obr. 64** Detekce IFN- $\gamma$  II



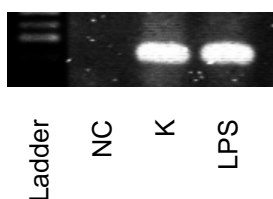
Gen pro TNF- $\alpha$  II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 65).

**Obr. 65** Detekce TNF- $\alpha$  II



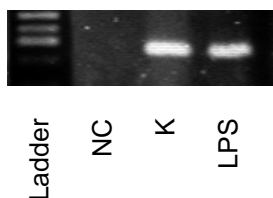
Gen pro TGF- $\beta$  II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 66).

**Obr. 66** Detekce TGF- $\beta$  II



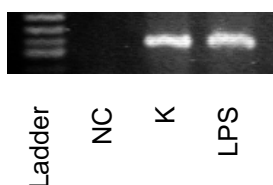
Gen pro IL-10 II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 67).

**Obr. 67** Detekce IL-10 II



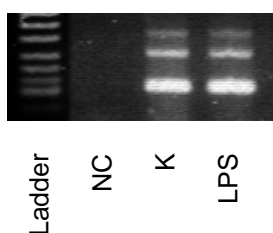
Gen pro IL-12 II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 68).

**Obr. 68** Detekce IL-12 II



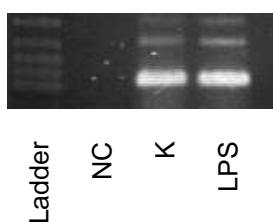
Gen pro IL-15 II byl nejprve amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 69).

**Obr. 69** Detekce IL-15 II



Kvůli nespecifickým reakcím byl gen pro IL-15 II amplifikován po dobu 40 cyklů a teplota „annealing“ byla zvýšena na 61 °C (Obr. 70).

**Obr. 70** Detekce IL-15 II

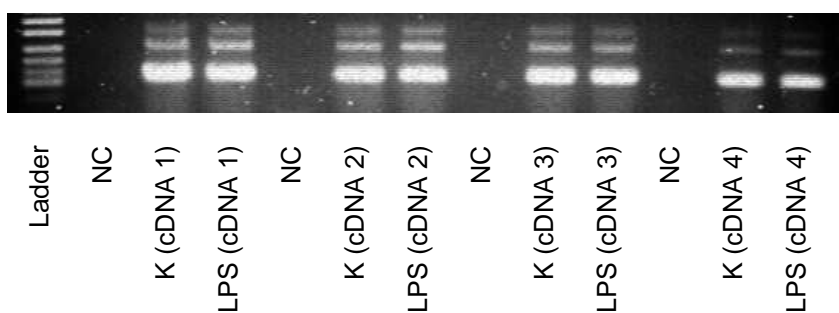


Pro primery pro IL-15 II byla provedena optimalizace koncentrace  $MgCl_2$  (Obr. 71 a 72) a TrueStart Taq DNA polymerázy (Obr. 73). K amplifikaci byl použit 1  $\mu l$  vzorku a množství  $MgCl_2$  a TrueStart Taq DNA polymerázy podle tabulky 21 a 22. Amplifikace probíhala po dobu 40 cyklů a teplotě „annealing“ 60 °C.

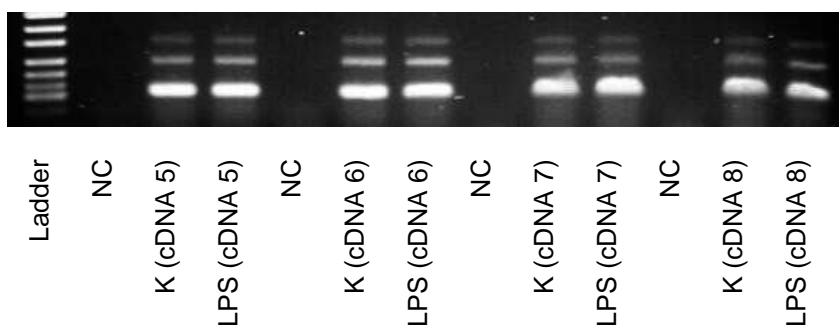
**Tab. 21** Výsledná koncentrace  $MgCl_2$ , množství  $MgCl_2$  a RNase<sup>-</sup> vody použité pro amplifikaci

Označení vzorků	Výsledná koncentrace $MgCl_2$ (mM)	Množství $MgCl_2$ ( $\mu l$ )	Množství RNase <sup>-</sup> vody ( $\mu l$ )
cDNA 1	1,5	0,75	19,5
cDNA 2	2	1	19,25
cDNA 3	2,5	1,25	19
cDNA 4	3	1,5	18,75
cDNA 5	3,5	1,75	18,5
cDNA 6	4	2	18,25
cDNA 7	4,5	2,25	18,
cDNA 8	5	2,5	17,75

**Obr. 71** Detekce IL-15 II



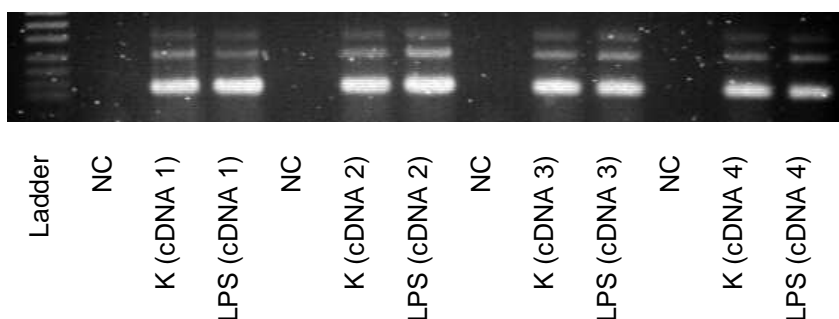
**Obr. 72** Detekce IL-15 II



**Tab. 22** Výsledná koncentrace TrueStart Taq DNA polymerázy, množství TrueStart Taq DNA polymerázy a RNase<sup>-</sup> vody použité pro amplifikaci

Označení vzorků	Výsledná koncentrace Taq polymerázy (units)	Množství Taq polymerázy (μl)	Množství RNase <sup>-</sup> vody (μl)
cDNA 1	0,60	0,13	19,37
cDNA 2	0,95	0,19	19,31
cDNA 3	1,25	0,25	19,25
cDNA 4	2,00	0,38	19,12

**Obr. 73** Detekce IL-15 II



Podařilo se zoptimalizovat primery pro tyto geny: IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II a IL-12 II. Nepodařilo se optimalizovat pouze primer pro IL-15 II. V optimalizaci tohoto primeru se dále nepokračovalo.

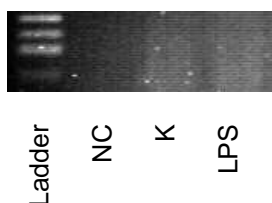
Byly objednány také nové primery (pojmenovány III) pro geny: IL-1 $\beta$  III, IL-15 III a LT- $\alpha$  III, jejich funkčnost byla už prokázána.<sup>56</sup> I pro tyto primery bylo však nutné provést optimalizaci pro námi používanou buněčnou linii.

Vzorky pro amplifikaci těchto genů byly připraveny podle tabulky 20. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu$ l. Vzorky byly inkubovány v termocykleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2–4 byly opakovány 33krát:

94 °C	10 minut
94 °C	1 minuta
60 °C	1 minuta
72 °C	1 minuta
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

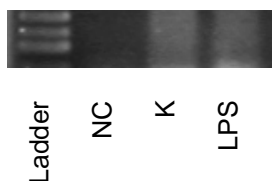
Gen pro IL-1 $\beta$  III byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“ 60 a 65 °C (Obr. 74). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 74** Detekce IL-1 $\beta$  III (teplota „annealing“ 60 °C)



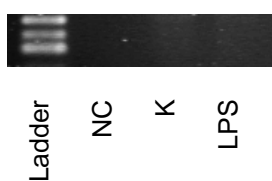
Gen pro IL-15 III byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“ 60 a 65 °C (Obr. 75). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 75** Detekce IL-15 III (teplota „annealing“ 60 °C)



Gen pro LT- $\alpha$  III byl amplifikován po dobu 33 cyklů. Byly vyzkoušeny teploty „annealing“: 60 a 65 °C (Obr. 76). Tento primer se nepodařilo zoptimalizovat.

**Obr. 76** Detekce LT- $\alpha$  III (teplota „annealing“ 60 °C)



Přestože byly primery odzkoušeny na B-buněčné linii a my dodrželi podmínky amplifikace bohužel se primery pro geny IL-1 $\beta$  III, IL-15 III a LT- $\alpha$  III nepodařilo zoptimalizovat.

## 4.5 Experiment č. 5

Vzhledem k tomu, že se nám podařilo zoptimalizovat amplifikaci pro primery pro IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II a IL-12 II, byl proveden nový pokus s infekcí. Buněčná linie Ramos byla oproti předchozím experimentům infikována *F. tularensis* LVS, zabitou *F. tularensis* LVS nebo stimulována LPS (*E. coli*) a rekombinantním proteinem IgIC po dobu 6, 12 a 24 hodin. Izolace RNA byla provedena pomocí RNeasy Mini Kit. K syntéze cDNA bylo použito 15  $\mu$ l směsi RNA a RNase<sup>-</sup> vody a 1,5  $\mu$ l Oligo T18VN primeru a 1  $\mu$ l M-MLV reverzní transkriptázy. Množství RNA pro syntézu cDNA je uvedeno v tabulce 23.

**Tab. 23** Kontrola kvality RNA, koncentrace RNA a množství RNA použité pro syntézu cDNA

Označení vzorku	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Koncentrace RNA ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	Množství RNA pro syntézu cDNA ( $\mu$ l)
K 6	1,93	1,68	0,853	4,69
FSC 6	2,01	1,40	0,754	5,31
Killed 6	2,06	1,41	0,686	5,83
LPS 6	2,05	1,50	0,718	5,57
IgIC 6	2,03	1,52	0,728	5,49
K 12	2,04	1,49	0,708	5,65
FSC 12	2,04	1,46	0,715	5,59
Killed 12	2,01	1,60	0,722	5,54
LPS 12	2,02	1,47	0,739	5,41
IgIC 12	1,90	1,31	0,745	5,37
K 24	2,00	1,38	0,766	5,22
FSC 24	2,04	1,59	0,695	5,76
Killed 24	2,05	1,70	0,602	6,64
LPS 24	2,02	1,39	0,745	5,37
IgIC 24	2,05	1,60	0,513	7,80

K 6, K 12, K 24 – kontrolní buňky po 6, 12 a 24hodinové inkubaci

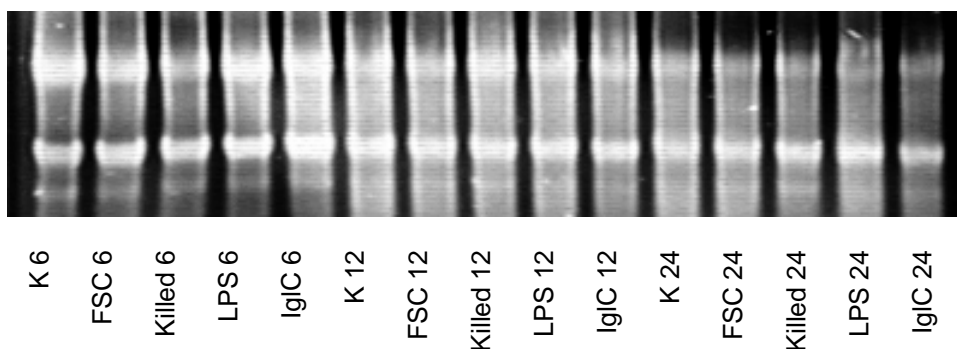
FSC 6, FSC 12, FSC 24 – buňky infikované *F. tularensis* LVS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Killed 6, Killed 12, Killed 24 – buňky stimulované zabitou *F. tularensis* FSC200 po dobu 6, 12 a 24 hodin

LPS 6, LPS 12, LPS 24 – buňky stimulované LPS po dobu 6, 12 a 24 hodin

Kontrola kvality RNA byla zhodnocena také na 1,2% agarózovém gelu s přídatkem 10x FA pufru (Obr. 77).

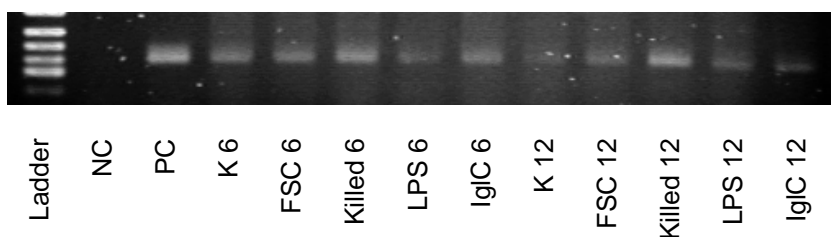
**Obr. 77** Kvalita RNA



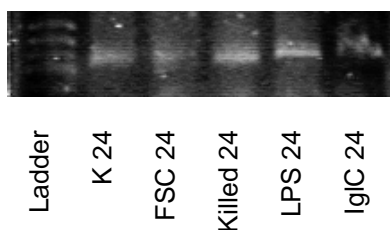
Celkový objem pro syntézu cDNA byl 40  $\mu$ l. Ke směsi vzorku RNA a RNase<sup>-</sup> vody o celkovém objemu 20  $\mu$ l byly přidány 2  $\mu$ l Oligo T18VN primeru a 2  $\mu$ l dNTPmixu. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 65 °C v termocycleru. Poté bylo přidáno 8  $\mu$ l 5x First Strand Buffer, 4  $\mu$ l 0,1 M DTT a 2  $\mu$ l RNaseOUT. Směs byla inkubována 2 minuty při 37 °C. Nakonec byly přidány 2  $\mu$ l M-MLV reverzní transkriptázy a inkubováno 50 minut při 37 °C a 15 minut při 70 °C.

Ke standardizaci na  $\beta_2$ -microglobulin II (Obr. 78 a 79) byly použity 2  $\mu$ l cDNA a 23  $\mu$ l PCR mixu. Bylo amplifikováno po dobu 28 cyklů při teplotě „annealing“ 60°C. V negativní kontrole byla nahrazena cDNA 2,0  $\mu$ l RNase<sup>-</sup> vody. Pozitivní kontrola byla připravena tisícinásobným zředěním ze vzorku pozitivního při předchozí amplifikaci. Jako standard byl použit pUC Mix Marker.

**Obr. 78** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin II





**Obr. 79** Standardizace na  $\beta_2$ -microglobulin II

Vzorky pro amplifikaci genů pro IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II a IL-12 II byly připraveny podle tabulky 24. Celkový objem PCR mixu a cDNA byl 25  $\mu$ l.

**Tab. 24** Množství komponent pro přípravu PCR mixu

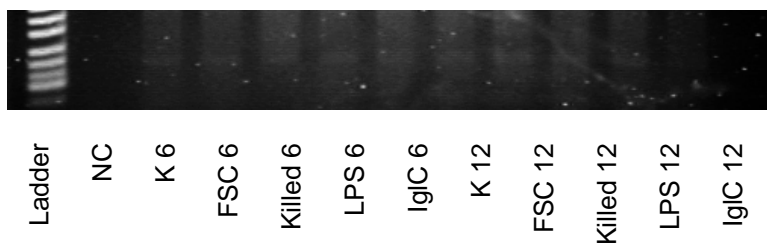
Komponenty	Původní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství ( $\mu$ l)
RNase <sup>-</sup> voda	-	-	18,25
TrueStart Taq Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1
dNTP mix	10 mM	200 $\mu$ M	0,5
Sense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
Antisense Primer	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,25
TrueStart Taq DNA polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1,25 units	0,25
cDNA	-	-	2

Vzorky byly inkubovány v termocycleru podle následujícího teplotního profilu, kroky 2 a 3 byly opakovány 40krát:

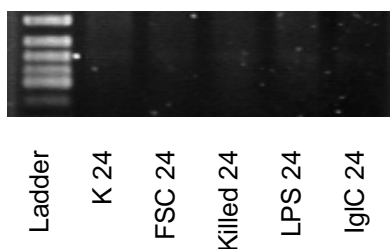
95 °C	10 minut
95 °C	15 sekund
60 °C	1 minuta
72 °C	5 minut
4 °C	$\infty$

Gen pro IFN- $\gamma$  II byl nejprve amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 80 a 81).

**Obr. 80** Detekce IFN- $\gamma$  II

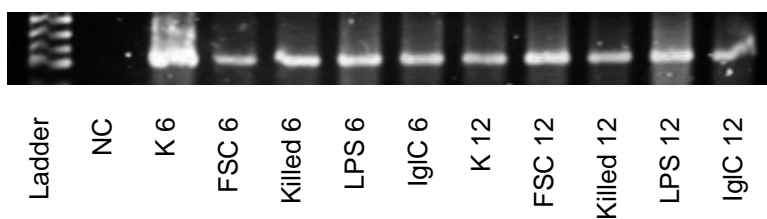


**Obr. 81** Detekce IFN- $\gamma$  II

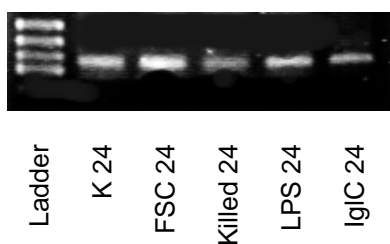


Kvůli negativnímu výsledku byla amplifikace opakována a množství cDNA zvýšeno na 3  $\mu$ l (Obr. 82 a 83).

**Obr. 82** Detekce IFN- $\gamma$  II



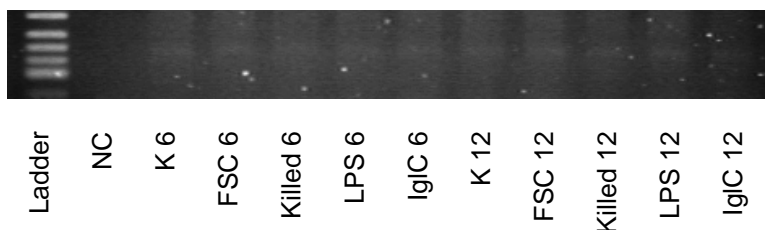
**Obr. 83** Detekce IFN- $\gamma$  II



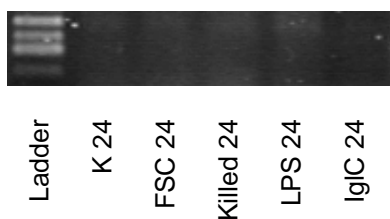
Expresie genu pro IFN- $\gamma$  II po infekci *F. tularensis* postupně rostla s časem. Po 3 hodinách nelze porovnat genovou expresi s kontrolními buňkami, protože exprese kontrolních buněk tomto časovém intervalu byla z neznámých důvodů nadměrně zvýšená. Po 12 hodinách byla exprese buněk infikovaných *F. tularensis* zvýšená oproti kontrolním buňkám a po 24 hodinách byl rozdíl exprese ještě vyšší. Expresie tohoto genu po infekci zabitou *F. tularensis* se naopak postupně s časem snižovala. Po 3 hodinách byla exprese genu u buněk infikovaných zabitou *F. tularensis* nejvyšší. Po 12 hodinách byla exprese genu srovnatelná s kontrolním buňkám a po 24 hodinách byla exprese nižší než u kontrolních buněk. Expresie genu po stimulaci rekombinantním proteinem IgIC se během časových intervalů neměnila a byla shodná s kontrolními buňkami.

Gen pro TNF- $\alpha$  II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 84 a 85). K amplifikaci byly použity 2  $\mu$ l cDNA.

**Obr. 84** Detekce TNF- $\alpha$  II



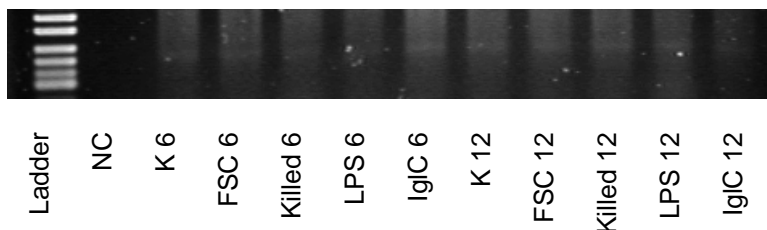
**Obr. 85** Detekce TNF- $\alpha$  II



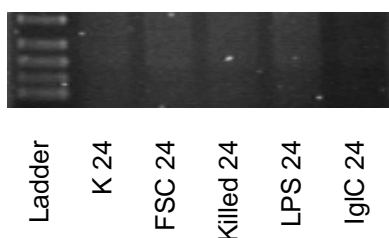
Expresi genů pro TNF- $\alpha$  II se již z časových důvodů nepodařilo optimalizovat. Zřejmě by bylo nutné zvýšit množství cDNA pro amplifikaci.

Gen pro TGF- $\beta$  II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 86 a 87). K amplifikaci byly použity 2  $\mu$ l cDNA.

**Obr. 86** Detekce TGF- $\beta$  II



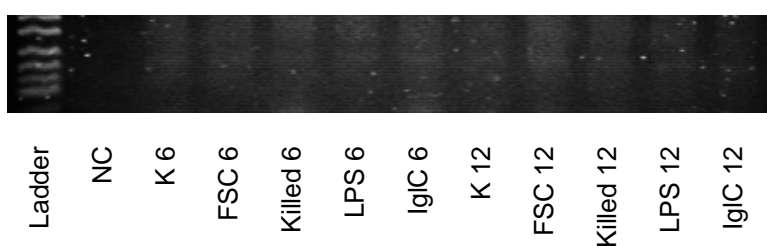
**Obr. 87** Detekce TGF- $\beta$  II



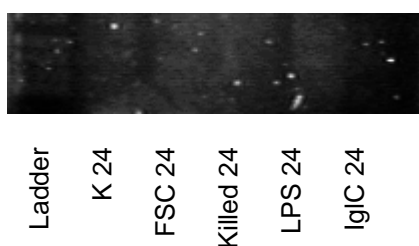
I v tomto případě se expresi genů již z časových důvodů nepodařilo zoptimalizovat a bylo by nutné opět zvýšit množství cDNA pro amplifikaci.

Gen pro IL-10 II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealingu“ 60 °C (Obr. 88 a 89). K amplifikaci byly použity 2  $\mu$ l cDNA.

**Obr. 88** Detekce IL-10 II



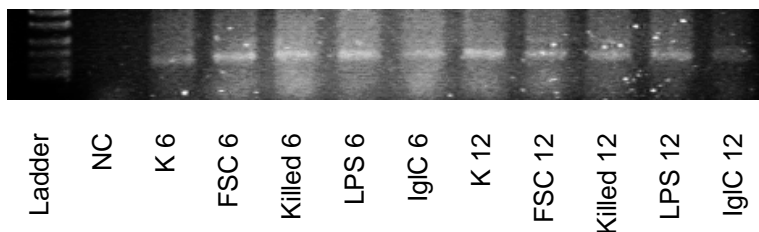
**Obr. 89** Detekce IL-10 II



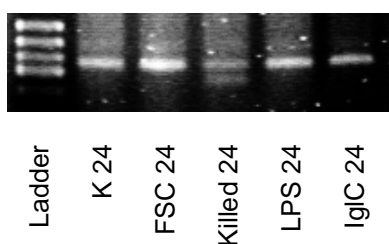
Expres genů pro IL-10 II se již z časových důvodů nepodařilo zoptimalizovat. Zřejmě by bylo nutné opět zvýšit množství cDNA pro amplifikaci.

Gen pro IL-12 II byl amplifikován po dobu 40 cyklů při teplotě „annealing“ 60 °C (Obr. 90 a 91), množství přidané cDNA bylo zvýšeno na 3 μl cDNA.

**Obr. 90** Detekce IL-12 II



**Obr. 91** Detekce IL-12 II



Expres genu pro IL-12 II byla u kontrolních, infikovaných i stimulovaných buněk v 6hodinovém a 12hodinovém intervalu shodná. Pouze po 24 hodinách u buněk infikovaných *F. tularensis* byla exprese oproti kontrolním buňkám zvýšená.

Z časových důvodů se v experimentu dále nepokračovalo.

## 5 Diskuze

Předpokládaným cílem této diplomové práce bylo sledování změn v expresi genů pro receptory vázající složky *F. tularensis* a pro cytokiny či chemokiny, které by mohly mít důležitou roli v časně imunitě proti této bakterii. Největší část práce však byla věnována optimalizaci podmínek a ověřování kvality primerů.

Vzhledem k negativním výsledkům detekce exprese  $\beta$ -actinu, byla provedena kontrola kvality primerů pro tento „housekeeping“ gen pomocí kontrolního RT-PCR setu. Výsledkem byla negativní amplifikace u vzorků, u kterých byl použit primer pro  $\beta$ -actin. Proto byl v dalších reakcích pro standardizaci exprese genů jednotlivých vzorků cDNA používán primer pro  $\beta_2$ -microglobulin.

Byla také provedena kontrola kvality izolace vzorků RNA. Hodnota podílu absorbance  $A_{260/280}$  by měla být pro čistou RNA okolo 2,0 a hodnota  $A_{260/230}$  pro nukleové kyseliny 2,0-2,2. Na přístroji NanoPhotometer byla naměřena hodnota  $A_{260/280}$  jen o málo nižší, ale velmi nízká hodnota  $A_{260/230}$ . Velké snížení bylo zřejmě důsledkem vyšší absorbance vzorku při 230 nm. To mohlo být způsobeno přítomností aromatických látek (např. fenol), sacharidů, EDTA nebo močoviny ve vzorcích. Fenol absorbuje při 270 a 230 nm. Vzhledem k tomu, že vzorky RNA byly izolovány pomocí TRIzol, což je fenolický roztok, nasvědčovala velmi nízká hodnota  $A_{260/230}$  právě na přítomnost fenolu. Ten mohl negativně ovlivňovat další kroky RT-PCR.<sup>54</sup> Proto byla v dalším experimentu provedena izolace vzorků RNA pomocí TRIzol a RNeasy Mini Kit a porovnány výsledné poměry absorbancí  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  a výtěžnost.

Hodnota podílu  $A_{260/230}$  byla u vzorků RNA izolovaných pomocí TRIzol téměř o polovinu nižší ve srovnání se vzorky RNA izolovaných pomocí RNeasy Mini Kit. To poukázvalo na kontaminaci TRIzol. I  $A_{260/280}$  byla u vzorků RNA izolovaných pomocí TRIzol nižší oproti vzorkům RNA izolovaných pomocí RNeasy Mini Kit. I když má metoda izolace RNA pomocí TRIzol vyšší výtěžnost, tak vzhledem k výše uvedeným negativním důsledkům, byla v dalších experimentech prováděna izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit.

Po infekci buněk Ramos *F. tularensis*, izolaci RNA pomocí RNeasy Mini Kit a standardizaci vzorků cDNA s použitím primerů pro  $\beta_2$ -microglobulin, byla provedena detekce exprese vybraných genů. Výsledky amplifikace však byly opět negativní. Protože primery pro zkoumané geny byly nově navrženy v programu „LightCycler Probe Design“ a nebyla ověřena jejich funkčnost, byla následně provedena optimalizace primerů na vzorcích ovlivněných LPS (*E. coli*). LPS byl použit jako pozitivní kontrola pro aktivaci NF- $\kappa$ B u B buněk, pro zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů a zvýšenou expresi TLR4. LPS se také používá jako nespecifický mitogen pro zvýšenou proliferaci B buněk.<sup>10</sup>

Na povrchu B buněk jsou exprimovány 2 receptory pro LPS, a to TLR4 a RP105. Jejich aktivací se spustí dvě nezávislé signální cesty. Receptor TLR4 je exprimován na různých typech buněk imunitního systému. Receptor RP105 je preferenčně exprimován na B buňkách. Stimulací TLR4 je aktivována signální cesta vedoucí přes MyD88, IRAK a TRAF6 k transkripčnímu faktoru NF- $\kappa$ B. Stimulací RPI05 se aktivuje buď signální cesta přes proteiny Lyn, CD19 a Vav vedoucí k JNK nebo signální cesta přes PI3K a Btk vedoucí k NF- $\kappa$ B.

Neaktivní NF- $\kappa$ B se vyskytuje v cytoplazmě v komplexu s inhibičními proteiny I $\kappa$ B- $\alpha$  a I $\kappa$ B- $\beta$ . Aktivací signální dráhy dochází k fosforylaci a degradaci inhibičních proteinů. Uvolněný NF- $\kappa$ B je translokován do jádra, kde se váže na cílové sekvence a aktivuje transkripci genů pro cytokiny a chemokiny. Jedním z možných mechanismů, kterým je zabráněno aktivaci NF- $\kappa$ B u buněk stimulovaných LPS, je podle Nomura a kol. snížená exprese receptorů TLR.<sup>57</sup> Podle Telepneva a kol. je tato inhibice TLR receptorů spíše důsledkem blokady intracelulárních signálních cest.<sup>45</sup> Schopnost inhibovat aktivaci NF- $\kappa$ B byla popsána u intracelulárních bakterií *Leishmania donovani*, *Yersinia enterocolica* a u vývojového stádia tachyzoit intracelulárního prvoka *Toxoplasma gondii*. *Yersinia enterocolica* a *Toxoplasma gondii* inhibují NF- $\kappa$ B stejným mechanismem. Zabraňují fosforylaci a degradaci inhibičních proteinů I $\kappa$ B- $\alpha$  a I $\kappa$ B- $\beta$ , a tím aktivaci NF- $\kappa$ B. U *Leishmania donovani* zatím mechanismus inhibice NF- $\kappa$ B nebyl zcela objasněn, zřejmě souvisí se zvýšenou intracelulární hladinou ceramidu a potlačením ERK.<sup>58, 59</sup>

Na vzorcích ovlivněných LPS (*E. coli*) se podařilo zoptimalizovat pouze primery pro tyto geny: IRF-3, IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNFR-CD40, TLR8 a GM-CSF. Nebyly pozorovány rozdíly v expesi genů vzorků stimulovaných LPS oproti kontrolním buňkám. Bohužel, s časových důvodů nebyly tyto zoptimalizované primery použity k detekci genové exprese B buněk po infekci *F. tularensis*.

V dalších experimentech byly použity nové primery (pojmenované II) pro  $\beta_2$ -microglobulin II, IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II, IL-12 II a IL-15 II, jejichž funkčnost už byla prokázána.<sup>55</sup> Také byly nově použity primery (pojmenovány III) pro geny: IL-1 $\beta$  III, IL-15 III a LT- $\alpha$  III s prokázanou funkčností.<sup>56</sup> I pro tyto primery však bylo nutné provést optimalizaci pro námi používanou B buněčnou linii Ramos.

Na vzorcích ovlivněných LPS (*E. coli*) se podařilo zoptimalizovat primery pro IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II a IL-12 II. Rozdíly v expesi genů vzorků stimulovaných LPS oproti kontrolním buňkám však nebyly opět pozorovány. Oproti ostatním experimentům, kdy byla provedena infekce bakteriálním kmenem *F. tularensis* FSC200, byl u těchto vzorků použit kmen *F. tularensis* LVS. Vzhledem k tomu, že oba tyto kmeny stimulují makrofágy stejným způsobem k produkci cytokinů a B buňky k apoptóze, neměla by tato změna mít vliv na výsledky genové exprese.

Nově byly také vzorky stimulovány rekombinantním proteinem IgIC (r-IgIC). Důvodem bylo navázat na pokus, který byl proveden Kročovou a kol. V jejich práci byla detekována snížená apoptóza (průtoková cytometrie, AnnexinV) u B buněk po infekci *F. tularensis* s delecí genu pro IgIC ( $\Delta$ IgIC) a zvýšená apoptóza po stimulaci r-IgIC. Po 24 hodinách prodělalo apoptózu 38% buněk infikovaných mutantem  $\Delta$ IgIC oproti 90% apoptotických buněk, které byly infikovány divokým kmenem. U vzorků, ke kterým byl přidán r-IgIC o koncentraci 100  $\mu$ g/ml, prodělalo apoptózu 90% buněk. I po naředění r-IgIC na koncentraci 10 pg/ml způsoboval apoptózu u 40% buněk. U neinfikovaných buněk se v obou pokusech vyskytovalo okolo 13 % apoptotických buněk (dosud nepublikovaná data).

U vzorků po infekci *F. tularensis* LVS se podařilo zoptimalizovat pouze primery pro IFN- $\gamma$  II a IL-12 II. Ostatní primery se již z časových důvodů



optimalizovat nepodařilo. Bylo by zřejmě ještě nutné zvýšit množství cDNA přidávané do reakce pro amplifikaci genů.

IFN- $\gamma$  je základní cytokin účastnící se vrozených i adaptivních imunitních mechanismů proti infekcím způsobených intracelulárními bakteriemi a viry a účastnících se kontroly nádorů. Tento interferon II. třídy má schopnost aktivovat makrofágy a zvyšovat jejich lysosomální aktivitu a antigenní prezentaci, potlačovat T<sub>H2</sub> imunitní reakci a podporovat aktivitu NK buněk.<sup>60</sup> B buňky jsou schopny sekretovat mnoho cytokinů, např. IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 a TNF- $\alpha$ , ale ne IFN- $\gamma$ . Podle Culkin a kol. IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  a  $\beta$  jsou důležité regulátory produkce IFN- $\gamma$  a aktivace makrofágů během intracelulární infekce včetně *F. tularensis* LVS. B buňky by mohly přímo interagovat s jinými buňkami, např. s NK buňkami, jejichž aktivace vede ke zvýšené produkci IFN- $\gamma$ .<sup>48</sup> Z výzkumu Matsumoto a kol. vyplývá, že B buňky mohou přímo interagovat s NK buňkami a jejich aktivace vede ke zvýšené produkci IFN- $\gamma$ .<sup>61</sup> B lymfocyty tedy hrají důležitou roli v obraně proti gramnegativním bakteriálním infekcím.

Na rozdíl od uvedených publikací byla v naší práci detekována exprese genu pro IFN- $\gamma$  II u B buněk po infekci *F. tularensis* LVS, která se postupně zvyšovala s časem. Po 3 hodinách nebylo možné porovnat genovou expresi s kontrolními buňkami, protože exprese kontrolních buněk tomto časovém intervalu byla z neznámých důvodů nadměrně zvýšená. Po 12 hodinách byla exprese buněk infikovaných *F. tularensis* LVS zvýšená oproti kontrolním buňkám a po 24 hodinách byl rozdíl exprese ještě vyšší. Zvýšená exprese genu po 12 a 24 hodinách se shoduje s publikovanými výsledky Chen a kol., kteří stanovili zvyšující se hladinu tohoto cytokinu v séru infikovaných myší.<sup>62</sup> Expese genu pro IFN- $\gamma$  II po infekci zabitou *F. tularensis* LVS se naopak postupně s časem snižovala. Po 3 hodinách byla tedy exprese genu u buněk infikovaných zabitou bakterií nejvyšší, po 12 hodinách srovnatelná s kontrolním buňkám a po 24 hodinách nižší než u kontrolních buněk. Expese genu po stimulaci r-IgIC se během časových intervalů neměnila a byla shodná s kontrolními buňkami. Nepodařilo se najít žádné literární zdroje, ve kterých by byl popsán vliv mrtvé bakterie *F. tularensis* a r-IgIC na B buňky.

IL-12 je heterodimerní cytokin o velikosti 70 kDa, který je tvořen 2 proteiny: IL-12p35 a IL-12p40. Hlavními cílovými buňkami IL-12 jsou NK a T

buňky, u kterých navozuje produkci cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1), stimuluje proliferaci a jejich cytotoxickou aktivitu a indukkuje T<sub>H</sub>1 imunitní reakci. Také zvyšuje expresi svého vlastního receptoru na aktivovaných T a NK buňkách, což má za následek další produkci IFN- $\gamma$ . Díky této pozitivní zpětné vazbě, je tento cytokin důležitou součástí imunitních obranných mechanismů proti intracelulárním infekcím.<sup>63</sup>

Expresí genu pro IL-12 p135 byla u kontrolních, infikovaných i stimulovaných buněk v 6hodinovém a 12hodinovém intervalu shodná. Expresí genu se zvýšila po 24 hodinách a to pouze u buněk infikovaných živou bakterií *F. tularensis*. Toto detekované zvýšení roste s časem se opět shoduje s publikovanými výsledky Chen a kol., kteří stanovili zvyšující se hladinu tohoto cytokinu v séru infikovaných myší.<sup>62</sup> Ve výsledcích Björkbacka a kol. rostoucí hodnota IL-12 u makrofágů infikovaných *E. coli* nasvědčovala na spuštění MyD88-dependentní signální dráhy.<sup>64</sup>

TNF- $\alpha$  je základní cytokin účastnící se imunitní odpovědi proti bakteriálním, virovým, houbovým i parazitárním infekcím. Je schopen indukovat buněčnou apoptózu, inhibovat růst nádorů a replikaci virů. Indukuje lokální zánět a stimuluje tvorbu proteinů akutní fáze v játrech. Působí také jako chemoatraktant pro neutrofile a stimuluje fagocytózu u makrofágů. Ve velké koncentraci může navodit šokový stav.<sup>65, 66</sup>

Z předchozích výzkumů vyplývá, že IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  jsou klíčovými cytokiny účastnící se imunitní odpovědi na infekce způsobené intracelulárními patogeny, jako jsou *Listeria monocytogenes*,<sup>67</sup> *Francisella tularensis* LVS,<sup>68</sup> *Mycobacteria*,<sup>69</sup> *Salmonella*,<sup>70</sup> *Leishmania*<sup>71</sup> a *Toxoplasma gondii*.<sup>72</sup> Telepnev a kol. popsal schopnost *F. tularensis* inhibovat signální cesty přes TLR. Po infekci monocyto-makrofágové linie J774 *F. tularensis* LVS došlo k blokádě intracelulárních signálních cest vedoucí k NF- $\kappa$ B, p38 a c-Jun. Infikované buňky neprodukovaly TNF- $\alpha$  a IL-1 ani po stimulaci *E. coli* LPS nebo BLP.<sup>45</sup>

TGF- $\beta$  je cytokin s protizánětlivým účinkem. Kontroluje proliferaci, diferenciaci a homeostatické mechanismy u většiny buněk. Hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a je schopen indukovat apoptózu. Blokuje přestup buňky přes G1 fázi tím, že inhibuje cyklin-dependentní kinázy (cdk2, cdk4 a cdk6) a snižuje expresi genu c-Myc. TGF- $\beta$  ovlivňuje CD25<sup>+</sup> T lymfocyty.<sup>73</sup>

IL-10 je protizánětlivý cytokin s pleiotropním imunoregulačním účinkem. Snižuje expresi cytokinů účastnících se T<sub>H</sub>1 imunitní reakce. Způsobuje také snížení kostimulačních molekul působících na makrofágy a MHC II. třídy. U B buněk stimuluje proliferaci a produkci protilátek. Může blokovat aktivitu NFκB a je zapojen do JAK-STAT signální dráhy. Studie na „knock-out“ myších (IL-10<sup>-/-</sup>) naznačují, že tento cytokin hraje důležitou roli v imunoregulaci intestinálního traktu. Je schopen inhibovat syntézu prozánětlivých cytokinů, jako jsou IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α a GM-CSF, které jsou produkovány makrofágy a T<sub>H</sub> lymfocyty.<sup>74, 75, 76</sup>

*Francisella tularensis* je fakultativně intracelulární gramnegativní bakterie, která je schopna infikovat fagocytující i nefagocytují buňky a následně se v nich rychle množit. Primárním cílem invaze intracelulárních a fakultativně intracelulárních mikroorganismů jsou makrofágy. Úloha B buněk během časně imunity byla dlouhou dobu opomíjena. Přímá interakce intracelulární bakterie s B buňkami byla poprvé popsána Menonem a kol. Zjistil, že *Listeria monocytogenes* je schopna interagovat s B buňkami a způsobit jejich apoptózu.<sup>52</sup> Nedávno byla detekována přímá interakce mezi *F. tularensis* a lidskými B buňkami Ramos Kročovou a kol. Výsledkem interakce byla také apoptóza B buněk.<sup>53</sup>

B buňky jsou schopny sekretovat mnoho mediátorů, ale dosud nebyla popsána produkce IFN-γ. To, že byla v průběhu infekce lidské B buněčné linie Ramos detekována exprese genu pro tento cytokin, lze vysvětlit jiným metodickým přístupem, než jaký byl použit v publikovaných pracích. Expres na genové úrovni metodou RT-PCR nemusí korelovat s extracelulárním uvolňováním cytokinu a jeho detekcí na proteinové úrovni. Vysvětlením může být i použití jiných B buněčných linií.

Další cytokin, který se podařilo detekovat po infekci buněk Ramos byl IL-12. K produkci IL-12 dochází po aktivaci NFκB. Zvýšená hladina tohoto cytokinu naznačuje, že po infekci *F. tularensis* LVS zřejmě dochází k aktivaci NFκB. Naproti tomu u makrofágů dochází po internalizaci *F. tularensis* k zablokování signálních cest vedoucích k NF-κB a potlačení produkce prozánětlivých cytokinů.<sup>45</sup>

Výše uvedené výsledky (zvýšená exprese genů pro IFN- $\gamma$  a IL-12 po infekci živými bakteriemi) této diplomové práce jasně ukazují na zapojení B buněk v časně imunitní odpovědi proti intracelulárnímu patogenu *F. tularensis*.

## 6 Závěr

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

Vzhledem k negativním výsledkům během detekce genové exprese byla provedena kontrola kvality primerů pro “housekeeping“ gen, kontrola kvality izolace vzorků RNA a optimalizace podmínek amplifikace. Pro standardizaci exprese genů jednotlivých vzorků cDNA byl poté používán primer pro  $\beta_2$ -microglobulin a izolace RNA byla prováděna pomocí RNeasy Mini Kit. Na vzorcích ovlivněných LPS (*E.coli*) byly zoptimalizovány primery pro geny pro IRF-3, IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNFR-CD40, TLR8, GM-CSF, IFN- $\gamma$  II, TNF- $\alpha$  II, TGF- $\beta$  II, IL-10 II a IL-12 II. Z časových důvodů se u infikovaných vzorků podařilo optimalizovat pouze geny pro IFN- $\gamma$  II a IL-12 II.

U B buněčné linie Ramos byla pozorována zvýšená exprese genu pro IFN- $\gamma$ , která rostla s časem. Dosud však nebyla popsána produkce IFN- $\gamma$  u B buněk a to, že byl tento cytokin námi detekován, lze vysvětlit jiným metodickým přístupem, než jaký byl použit v publikovaných pracích. Exprese na genové úrovni metodou RT-PCR nemusí korelovat s extracelulárním uvolňováním cytokinu a jeho detekcí na proteinové úrovni. Dále byla pozorována zvýšená exprese genu pro IL-12 ve 24hodinovém intervalu. Zřejmě tedy dochází k aktivaci NF $\kappa$ B a tím spuštění produkce prozánětlivých cytokinů. Tyto výsledky dokazují zapojení B buněk v časně imunitní odpovědi proti intracelulárnímu patogenu *F. tularensis*

## 7 Použitá literatura

1. Casadevall, A., Pirofski, L.: Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infection and Immunity*, 2000, 68: 6511–6518.
2. Hooper, L.V., Gordon, J.I.: Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science*, 2001, 292: 1115–1118.
3. Schnare, M., Barton, G.M., Czopik-Holt, A., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R.: Toll-like Receptors Control Activation of Adaptive Immune Responses. *Nature Immunology*, 2001, 2: 947-950.
4. Aderem, A., Ulevitch, R.J.: Toll-like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response. *Nature*, 2000, 406: 782-787.
5. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/prrecep.html> (5.2.2009).
6. McLendon, M.K., Apicella, M.A., Allen, L.A.H.: *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Bioware. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 167-185.
7. Forestier, C., Moreno, E., Méresse, S., Phalipon, A., Olive, D., Sansonetti, P., Gorvel, J.P.: Interaction of *Brucella abortus* Lipopolysaccharide with Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in B Lymphocytes. *Interaction and Immunity*, 1999, 67: 4048-4054.
8. <http://www.textbookofbacteriology.net/endotoxin.html> (5.2.2009).
9. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie. *Marvil*, 1996, s. 53-54.
10. Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R.: Structure and Function of Lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 2002, 4: 837-851.

11. Vinogradov, E., Malcolm, B., Conlan, P., Conlan, J.W.: Structural Analysis of *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 6112.
12. Ancuta, P., Pedron, T., Girard, R., Sandström, G., Chaby, R: Inability of the *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide to Mimic or to Antagonize the Induction of Cell Activation by Endotoxins. *Infection and Immunity*, 1996, 64: 2041-2046.
13. Dreisbach, V.C., Cowley, S., Elkins, K.L.: Purified Lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain (LVS) Induces Protective Immunity against LVS Infection That Requires B Cells and Gamma Interferon. *Infection and Immunity*, 2000, 68: 1988-1996.
14. Medzhitov, R.: Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Nature*, 2001, 1: 135-145.
15. Sandor, F., Buc, M.: Toll-like Receptors. II. Distribution and Pathways Involved in TLR signalling. *Folia Biologica*, 2005, 51: 188-197.
16. Krejsek, J., Kopecký, O.: Klinická imunologie. *Nucleus HK*, 2004, s. 461
17. Shizuo, A.: Toll-like Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 38105–38108.
18. Cohen-Sfady, M., Nussbaum, G., Pevsner-Fischer, M., Mor, F., Carmi, P., Zanin-Zhorov, A., Lider, O., Cohen, I.R.: Heat Shock Protein 60 Activates B Cells via the TLR4-MyD88 Pathway. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 3594-3602.
19. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R.J.: How we Detect Microbes and Respond to Them: the Toll-like Receptors and their Transducers. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74: 479-485.
20. Kato, A., Ogasawara, T., Homma, T., Saito, H., Matsumoto, K.: Lipopolysaccharide-Binding Protein Critically Regulates Lipopolysaccharide-Induced IFN- $\beta$  Signaling Pathway in Human Monocytes. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 6185-6194.

21. Pitha, P.M.: Unexpected Similarities in Cellular Responses to Bacterial and Viral Invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 695-696.
22. [http://sprojects.mmi.mcgill.ca/immunology/APC\\_text.htm](http://sprojects.mmi.mcgill.ca/immunology/APC_text.htm) (14.3.2009).
23. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit4/innate/antibody/antibody.html> (18.3.2009).
24. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit5/humoral/abydefense/overview.html> (18.3.2009).
25. Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M.: Natural Antibodies and Complement Link Innate and Acquired Immunity. *Immunology Today*, 2000, 21: 624-630.
26. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm> (19.3.2009).
27. <http://www.merck.com/mmhe/sec16/ch183/ch183c.html> (19.3.2009).
28. <http://sprojects.mmi.mcgill.ca/immunology/immuno3.htm> (19.3.2009).
29. Stall, A.M., Wells, S.M., Lam, K.P.: B-1 Cells: Unique Origins and Functions. *Immunology*, 1996, 8: 45-59.
30. Bouaziz, J.D., Yanaba, K., Tedder, T.F.: Regulatory B Cells as Inhibitors of Immune Responses and Inflammation. *Immunological Reviews*, 2008, 224: 201-214.
31. Paeng, N., Kido, N., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N., Naruse, M., Jiang, G.Z., Lwin, T., Yoshida, T., Yokochi, T.: Marked Reduction of Mouse Peritoneal CD5+ B Cells by Intraperitoneal Administration of Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 1997, 65: 122-126.
32. Clark, M.R., Massenbunrg, D., Siemasko, K., Hou, P., Zhang, M.: B-cell Antigen Receptor Signaling Requirements for Targeting Antigen to the MHC Class II Presentation Pathway. *Current Opinion in Immunology*, 2004, 16: 382-387.



33. Vascotto, F., Le Roux, D., Lankar, D., Faure-André, G., Vargas, P., Guermonprez, P., Lennon-Duménil A.M.: Antigen Presentation by B Lymphocytes: How Receptor Signaling Directs Membrane Trafficking. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19: 93-98.
34. Perrin-Cocon, L.A., Villiers, C.L., Gabert, F., Marche, P.N.: B Cell Receptors and Complement Receptors Target the Antigen to Intracellular Compartments. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 3564-3572.
35. Cheng, P.C., Steele, C.R., Gu, L., Song, W., Pierce, S.K.: MHC Class II Antigen Processing in B Cells: Accelerated Intracellular Targeting of Antigens. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 7171-7180.
36. Vidard, L., Kovacsovics-Bankowski, M., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Benacerraf, B., Rock, K.L.: Analysis of MHC Class II Presentation of Particulate Antigens by B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 1996, 156: 2809-2818.
37. Lindroth, K., Mastache, e.F., Roos, i., Fernández, A.G., Fernández C.: Understanding Thymus-independent Antigen-Induced Reduction of Thymus-dependent Immune Responses. *Immunology*, 2004, 112: 413–419.
38. Weintraub, A.: Immunology of Bacterial Polysaccharide Antigens. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 2539-2547.
39. Novotny, A.M.: Development of B Cells. *Houston Chronicle*, 2006.
40. Arias, M.A., Nores, J.E.R., Vita, N., Stelter, F., Borysiewicz, L.K., Ferrara, P., Labéta, M.O.: Human B Cell Function Is Regulated by Interaction with Soluble CD14: Opposite Effects on IgG1 and IgE Production. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 3480-3485.
41. <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/tularemia/biofacts/tularemiafactsheet.html> (12.2.2009).

42. Elkins, K.L., Cowley, S.C., Bosio, C.M.: Innate and Adaptive Immune Response to an Intracellular Bacterium, *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. *Microbes and Infection*, 2003, 5: 135-142.
43. Schulert, G.S., Allen, L.A.H.: Differential Infection of Mononuclear Phagocytes by *Francisella tularensis*: Role of the Macrophage Mannose Receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 80.
44. Sjöstedt, A.: Intracellular Survival Mechanisms of *Francisella tularensis*, a Stealth Pathogen. *Microbes and Infection*, 2006, 8: 561-567.
45. Telepnev, M., Golovniy, I., Grundström, T., Tärnvik, A., Sjöstedt, A.: *Francisella tularensis* Inhibits Toll-like Receptor-mediated Activation of Intracellular Signalling and Secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 from Murine Macrophages. *Cellular Microbiology*, 2003, 5: 41-51.
46. Clemens, D.L., Lee, B.Y., Horwitz, M.A.: *Francisella tularensis* Enters Macrophages via a Novel Process Involving Pseudopod Loops. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 5892-5902.
47. Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., Kwaik, Y.A.: *Francisella tularensis* Travels a Novel Twisted Road within Macrophages. *Trends in Microbiology*, 2006, 14: 37-44.
48. Culkin, S.J., Rhinehart-Jones, T., Elkins, K.L.: A Novel Role for B Cells in Early Protective Immunity to an Intracellular Pathogen, *Francisella tularensis* Strain LVS. *The Journal of Immunology*, 1997, 158: 73277-73284.
49. Elkins, K.L., Bosio, C.M., Rhinehart-Jones, T.R.: 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*, 1999, 67: 6002-6007.

50. 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.: CD19 Regulates Innate Immunity by the Toll-like Receptor RP105 Signaling in B Lymphocytes. *Blood*, 2003, 102: 1374-1380.
51. Lu, M., Zhang, M., Takashima, A., Weiss, J., Apicella, M.A., Li, X.H., Yuan, D., Munford, R.S.: Lipopolysaccharide Deacylation by an Endogenous Lipase Controls Innate Antibody Responses to Gram-negative Bacteria. *Nature Immunology*, 2005, 6: 989-994.
52. Menon, A., Shroyer, M.L., Wampler J.K., Chawan, C.B., Bhunia, A.K.: In vitro Study of *Listeria monocytogenes* Infection to Murine Pathway and Human Transformed B Cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2003, 26: 157-174.
53. Kročová, Z., Härtlová, A., Součková, D., Kroča, M., Macela, A., Stulík, J.: Interaction of B Cells with Intracellular Pathogen *Francisella tularensis*. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45: 79-85.
54. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (23.4.2009).
55. Boeuf, P., Vigan-Womas, I., Jublot, D., Loizon, S., Barale, J.C., Akanmori, B.D., Mercereau-Puijalon, O., Behr, C.: CyProQuant-PCR: a Real Time RT-PCR Technique for Profiling Human Cytokines, Based on External RNA Standards, Readily Automatable for Clinical Use. *BMC Immunology*, 2005, 6: 5.
56. Airoidi, I., Guglieilmino, R., Ghiotto, F., Corcione, A., Facchetti, P., Truini, M., Pistoia, V.: Cytokine gene Expression in Neoplastic B Cells from Human Mantle Cell, Follicular, and marginal Zone Lymphomas and in Their Postulated Normal Counterparts. *Cancer Research*, 2001, 61: 1285-1290.

57. Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., Akira, S.: Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-like Receptor 4 Expression. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 3476–3479.
58. Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Köhler, S., Heesemann, J., Rouot, B.: *Yersinia enterocolica* Impairs Activation of Transcription Faktor NF- $\kappa$ B: Involvement in the Induction of Programmed Cell Death and in the Suppresion of the Macrophage Tumor Necrosis Factor a Production. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, 187: 1069-1079.
59. Butcher, B.A., Kim, L., Iohnson, P.F., Denkers, E.Y.: *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Inhibit Proinflammatory Cytokine Induction in Infected Macrophages by Preventing Nuclear Translocation of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 2193-2201.
60. Pang, B.Y., Norihisa, Y., Benjamin, D., Kantor, R.R.S., Young, H.A.: Interferon- $\gamma$  Gene Expression in Human B-Cell Lines: Induction by Interleukin-2, Protein Kinase C Activators, and Possible Effect of Hypomethylation on Gene Regulation. *Blood*, 1992, 80: 724-732.
61. Matsumoto, A., Kinoshita, M., Ono, S., Tsujimoto, H., Majima, T., Habu, Y., Shinomiya, N., Seki, S.: Cooperative IFN- $\gamma$  Production of Mouse Liver B Cells and Natural Killer Cells Stimulated with Lipopolysaccharide. *Journal of Hepatology*, 2006, 45: 290-298.
62. Chen, W., KuoLee, R., Shen, H., Búsa, M., Conlan, J.W.: Toll-like Receptor 4 (TLR4) Plays a Relatively minor Role in Murine Defense against Primary Intradermal Infection with *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, 2005, 97: 151-154.
63. Romani, L., Puccetti, P., Bistoni, F.: Interleukin-12 in Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10: 611-636.

- 
64. Björkbacka, H., Fitzgerald, K.A., Huet, F., Li, X., Gregory, J.A., Lee, M.A., Ordija, C.M., Dowley, N.E., Golenbock, D.T., Freeman, M.W.: The Induction of Macrophage gene Expression by LPS Predominantly Utilizes MyD88-independent Signaling Cascades. *Physiol Genomics*, 2004, 19: 319-330.
65. [http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/cytokines\\_in.html](http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/cytokines_in.html) (29.4.2009).
66. Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., Gevaert, Y., Schaaf-Lafontaine, N., Roland, S., Mahieu, P., Malaise, M., De Groote, D., Louis, R., Belaiche, J.: Tumour Necrosis Factor (TNF) Gene Polymorphism Influences TNF-alpha Production in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Whole Blood Cell Culture in Healthy Humans. *Clinical and experimental Immunology*, 1998, 113: 401-406.
67. Rothe, J., Lesslauer, W., Lötscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Köntgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., Bluethmann, H.: Mice Lacking the Tumour Necrosis Factor Receptor 1 are Resistant to TNF-mediated Toxicity but Highly Susceptible to Infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 1993, 364:798-802.
68. Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T., Nacy, C.A., Winegar, R.K., Fortier, A.H.: T-cell-independent Resistance to Infection and Generation of Immunity to *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*, 1993, 61: 823-829.
69. Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Bloom, B.R.: An Essential Role for Interferon Gamma in Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178:2249-54.
70. Nauciel, C., Espinasse-Maes, F.: Role of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha in Resistance to *Salmonella typhimurium* Infection. *Infection and Immunity*, 1992, 60: 450-454.

71. Belosevic, M., Finbloom, D.S., Van Der Meide, P.H., Slayter, M.V., Nacy, C.A.: Administration of Monoclonal Anti-IFN-gamma Antibodies in vivo Abrogates Natural Resistance of C3H/HeN Mice to Infection with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 1989, 143: 1266-1274.
72. Hunter, C.A., Abrams, J.S., Beaman, M.H., Remington, J.S.: Cytokine mRNA in the Central Nervous System of SCID Mice Infected with *Toxoplasma gondii*: Importance of T-cell-independent Regulation of Resistance to *T. gondii*. *Infection and Immunity*, 1993, 61: 4038-4044.
73. Blain, S.W., Massagué, J.: Different Sensitivity of the TGF- $\beta$  Cell Cycle Arrest Pathway to c-Myc and MDM-2. *The Journal of Biological chemistry*, 2000, 275,: 32066-32070.
74. Fukatsu, K., Kudsk, K.A., Zarzaur, B.L., Wu, Y., Hanna, M.K., DeWitt, R.C.: TPN Decreases IL-4 and IL-10 mRNA Expression in Lipopolysaccharide Stimulated Intestinal Lamina Propria Cells but Glutamine Supplementation Preserves the Expression. *Shock*, 2001, 15:318-322.
75. Rennick, D.M., Fort, M.M.: Lessons From Genetically Engineered Animal Models XII. IL-10-deficient (IL-10 $^{-/-}$ ) Mice and Intestinal Inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278: G829-G833.
76. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., Bhan, A.K.: Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity*, 2002, 16: 219-230.