

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Změny v expresi povrchových znaků B buněk po infekci
F. tularensis

Bc. Jana Válková

Diplomová práce

2009

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Changes in the expression of surface markers of B cells
infected by *F. tularensis*

Bc. Jana Válková

Thesis
2009

Prohlášení:

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 skuteností, 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 a to do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezentováním a postupným svěřením své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 7. 5. 2009

Jana Válková

Ráda bych poděkovala RNDr. Zuzaně Krokové Ph.D. a doc. RNDr. Zuzaně Bílkové Ph.D. za zadání zajímavého tématu diplomové práce. RNDr. Zuzaně Krokové Ph.D. děkuji za pomoc, cenné rady a připomínky během mé inžinýrské praxe na Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové a za pomoc při zpracování této diplomové práce. Za výpomoc v laboratorii také děkuji paní laborantce Márii Šťábové.

Hlavně děkuji svým rodičům, bratrovi, příteli a blízkým příbuzným za psychickou podporu, trpělivost a materiální pomoc během celé doby mého studia. Také děkuji svým kamarádům za podporu a příjemně strávené chvíle volna.

ABSTRAKT

Francisella tularensis je fakultativně intracelulární bakterie způsobující onemocnění, tularémii, různých druhů savců včetně člověka. Při interakci s hostitelem je schopna infikovat různé buněčné populace. My jsme se zaměřili na studium B buněk, jejichž úloha v infekci *F. tularensis* byla afdonědávná považována za nepříliš významnou. V posledním desetiletí však byly publikovány práce, které ukazují na úlohu B buněk v získání imunity proti *F. tularensis*.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit změny v expresi povrchových znaků B buněk po infekci *F. tularensis*. Tyto změny jsme zkoumali na B buňkách Balb/c myši infikovaných *F. tularensis* FSC200 v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin. Zaměřili jsme se na slezinné CD19 B buňky po *in vivo* infekci a na peritoneální CD19 a CD5 B buňky jak po *in vivo*, tak po *ex vivo* infekci. Metodou průtokové cytometrie jsme analyzovali tyto aktivní molekuly: CD54, CD69, CD86, CD95, MHC II a CD11b/CD18.

Klíčová slova: *Francisella tularensis*, B buňky, aktivní markery.

ABSTRACT

Francisella tularensis is a facultative intracellular bacterium causing disease, tularemia, of different species of mammals, including humans. When interacts with the host it is able to infect different cell population. We focused on the study of B cells, that role in the infection of *F. tularensis* have been, until recently, regarded as not significant. However, several recently published studies showed important role of B cells in innate immunity to *F.tularensis* infection.

The aim of this thesis was to identify changes in the expression of surface markers of B cells infected by *F. tularensis*. We examined this changes on mice Balb/c B cells infected by *F. tularensis* FSC200 at intervals 24, 48 and 72 hours. We focused on CD19 splenic B cells infected *in vivo* and peritoneal CD5 and CD19 B cells infected both *in vivo* and *ex vivo*. Using flow cytometry, we analyzed these activation molecules: CD54, CD69, CD86, CD95, MHC II a CD11b/CD18.

Keywords: *Francisella tularensis*, B cells, activation markers

SEZNAM ZKRATEK

APC	buněky prezentující antigen
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
CD	cluster of differentiation
Cell Wash	roztok k promývání buněk
CR	komplementový receptor
CTLA-4	cytotoxický s T-lymfocytem spojený antigen-4
DD	smrtící doména
DISC	smrt-indukující signalizační komplex
FCV	vakuola obsahující <i>F. tularensis</i> (<i>F. tularensis</i> -containing vacuole)
FSC	elší rozptyl světla (forward scatter)
HSP60	protein tepelného šoku o velikosti 60-kDa
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula-1
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
Ii	invariantní řetězec
IL	interleukin
LFA-1	lymfocytový funkční asociovaný antigen-1
LPS	lipopolysacharid
LVS	live vaccine strain
Mac-1	makrofágový antigen-1
MFI	střední intenzita fluorescence (median fluorescence intensity)
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex
Myd-88	myeloid differentiation factor 88
MZ	marginální zóna
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NK	přírodní zabíječe (natural killer)
O.D.	optická denzita
PDGF	řasový faktor produkovaný destičkami
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (phosphate-buffered saline)

PIP3	fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát
SRCR	scavangerový receptor bohatý na cystein
SSC	bo ní rozptyl sv tla (side scatter)
TCR	T-bun ný receptor (T-cell receptor)
TLR	receptor skupiny Toll (Toll-like receptor)
TNF	faktor nekrotizující nádory
VCAM-1	vaskulární adhezivní molekula-1

OBSAH

1. ÚVOD	12
2. TEORETICKÁ ÁST	13
2.1 <i>Francisella tularensis</i>	13
2.1.1 Charakteristika <i>F. tularensis</i>	13
2.2 Interakce <i>F. tularensis</i> s hostitelskými bu kamií	14
2.2.1 Interakce <i>F. tularensis</i> s makrofágy, asná imunitaí	14
2.2.1.1 Interakce LPS <i>F. tularensis</i> s TLR-4 receptoremí	14
2.2.1.2 Receptor TLR-2í	16
2.2.1.3 Aktivace Aktí	17
2.2.1.4 Únik <i>F. tularensis</i> z fagozómuí	17
2.2.1.5 Autofágie <i>F. tularensis</i>	18
2.2.1.6 Fenotypový profil infikovaných bun kí	18
2.2.2 Interakce <i>F. tularensis</i> s B bu kamií	19
2.2.2.1 Úloha B bun k v infekci <i>F. tularensis</i> , asná odpov	19
2.2.2.2 Úloha protilátekí	19
2.2.2.3 P ímá interakce B bun k s <i>F. tularensis</i>	20
2.3 B bu kyí	21
2.3.1 Charakteristika B bun kí	21
2.3.2 Aktivace B bun k p es TLR, RP105 a CRí	22
2.3.2.1 Aktivace p es TLR-4-Myd88 cestuí	22
2.3.2.2 Aktivace p es RP105í	23
2.3.2.3 Aktivace p es CRí	23
2.3.3 B bu ky a bakterieí	23
2.4 Bun é povrchové markeryí	24
2.4.1 Fenotypiza ní markeryí	24
2.4.2 Aktiva ní markeryí	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ÁST	30
3.1 Poufítý materiálí	30
3.1.1 Bakterie a bu kyí	30
3.1.2 Média, roztoky a chemikálieí	30

3.1.3	Protilátky pro pr tokovou cytometrii	30
3.1.4	P ístroje a pom cky	31
3.2	Pracovní postupy	32
3.2.1	Kultivace bakteriálních bun k	32
3.2.2	P íprava bakteriální suspenze	32
3.2.3	Výsev a ode et CFU	33
3.2.4	Ur ení po tu a flivotnosti bun k	34
3.2.5	P íprava bun né suspenze	35
3.2.5.1	P íprava suspenze slezinných bun k po <i>in vivo</i> infekcí	35
3.2.5.2	P íprava suspenze peritoneálních bun k po <i>in vivo</i> infekcí	35
3.2.5.3	P íprava suspenze peritoneálních bun k po <i>ex vivo</i> infekcí	36
3.2.6	Lyzování erythrocyt	36
3.2.7	Zna ení bun k monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorofory	37
3.2.8	Analýza bun k pomocí pr tokové cytometrie	39
3.2.8.1	Postup p í analýze dat z pr tokové cytometrie	40
4.	VÝSLEDKY	43
4.1	Zm ny v povrchových molekulách peritoneálních B bun k po <i>in vivo</i> infekci <i>F. tularensis</i> FSC200, 24, 48 a 72 hodin	43
4.2	Zm ny v povrchových molekulách slezinných B bun k po <i>in vivo</i> infekci <i>F. tularensis</i> FSC200, 24, 48 a 72 hodin	56
4.3	Zm ny v povrchových molekulách peritoneálních B bun k po <i>ex vivo</i> infekci <i>F. tularensis</i> FSC200, 24, 48 a 72 hodin	59
5.	DISKUZE A ZÁV R	66
6.	LITERATURA	72

1. ÚVOD

Francisella tularensis subsp. *tularensis* je považována za potenciální biologickou zbraň díky své extrémní virulenci, nízké infekční dávce, snadnému šíření aerosolem a schopnosti způsobit vážné nemoci a smrt. Díky tomu je tato fakultativně intracelulární gram-negativní bakterie zařazena do kategorie A potenciálních agentů bioterorismu. Je tedy nutné prozkoumat všechny oblasti interakce tohoto patogenu s hostitelem. Touto problematikou se, mimo jiné, zabývá také Ústav molekulární patologie Univerzity obrany v Hradci Králové.

Francisella tularensis je schopna infikovat různé buňky a to jak lidské, tak zvířecí. V této diplomové práci jsme se zaměřili na interakci *F. tularensis* s B buňkami. Dříve se B buňkám v průběhu kontroly tularémie, nemoci způsobené *F. tularensis*, nepřiřizovala významná role. Avšak v poslední době byla prokázána úloha B buněk jak v pasivní, nespecifické imunitě, tak v adaptivní imunitě díky tvorbě specifických protilátek.

Cílem této práce bylo zhodnotit změny v expresi povrchových znaků slezinných CD19 B buněk a peritoneálních CD19 a CD5 B buněk Balb/c myši po infekci *F. tularensis* FSC200.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Francisella tularensis*

2.1.1 Charakteristika *F. tularensis*

Francisella tularensis (*F. tularensis*) je fakultativně intracelulární gram-negativní bakterie. Jedná se o aerobní nepohyblivý kokobacil, který netvoří spory. Tato bakterie je závislá na přítomnosti kyseliny glutamové a sloučenin obsahujících -SH skupinu (např. cystein). Je tedy náročná na kultivační podmínky. Byla objevena McCoyem a Chapinem v důsledku vypuknutí epidemie veverek v oblasti Tulare (Kalifornie) v roce 1911.

Řečnice *Francisellaceae* obsahuje pouze rod *Francisella*. Rozeznáváme čtyři subtypy *F. tularensis*: *F. tularensis* subspecies (subsp.) *tularensis* (nazývaný také *F. tularensis* typ A), *holarctica* (*F. tularensis* typ B), *mediaasiatica* a *novicida*.

F. tularensis je široce rozšířena na celé severní polokouli. Nachází se na území Spojených států, Kanady, Evropy, Asie a Japonska. Nejvirulentnější kmeny, které patří k subtypu *tularensis*, jsou omezeny na Severní Ameriku. V Evropě a Asii se vyskytuje především subtyp *holarctica*, který se nachází i na území České republiky.

F. tularensis způsobuje tularémii. Jedná se o zoonózu s přirodní ohniskovostí. Tato bakterie způsobuje onemocnění různých druhů savců, jako jsou zajáci, králíci, myši, hraboši, veverky, ondatry a bobři. Je přenosná i na člověka. Mezi způsoby přenosu patří přímý kontakt s infikovanými zvířaty, kousnutí klíštěm i hmyzem, nebo vdechnutí kontaminovaného materiálu i požití kontaminované vody. Vstupním místem infekce může být kůže, spojivkový vak, zafukovací trakt a plíce. Podle toho dále onemocnění na několik forem. K formě ulceroglandulární dochází při vstupu infekce přes poškozenou kůži. Okuloglandulární forma vzniká zanesením infekce do oka. Tyfoidální forma vzniká cestou alimentární, tedy požitím kontaminované potravy nebo vody. Nejméně závažná, avšak nejzávažnější, je forma plicní, k níž dochází při vdechnutí kontaminovaného aerosolu. Postup a závažnost nemoci jsou

velmi závislé jak na stavu imunity, tak na infekčním kmeni. Nemoci u lidí způsobují pouze *F. tularensis* subsp. *tularensis* a subsp. *holarctica*. *F. tularensis* subsp. *holarctica* je odpovědná za méně závažné případy tularémie. Vakcinační kmen (LVS nebo live vaccine strain) byl odvozen z tohoto subtypu. Nyní je široce užívaný pro studium tularémie. Subtyp *novicida* je pro lidi méně virulentní. Pro svou poměrně snadnou genetickou manipulaci a díky tomu, že způsobuje symptomy podobné tularémii u myši, je užitečný k rozluštění souhrny mezi *F. tularensis* a hostitelem.

In vivo se *F. tularensis* nachází v makrofázích, dendritických buňkách, hepatocytech, alveolárních epitelových buňkách a extracelulárně v krvi infikovaných myši. Virulence této bakterie souvisí s její schopností replikace uvnitř hostitelských buněk. Uniká rychle z fagozomu a replikuje se v cytozolu hostitelských buněk. Nakonec po replikaci a okolo 24 hodin po infekci může vniknout do endozomální části, která má vlastnosti autofágových vakuol.^{1, 2, 3}

2.2 Interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami

Francisella tularensis je schopna infikovat různé buňky, a to jak lidské, tak zvířecí. Jak již bylo uvedeno, *in vivo* se *F. tularensis* nachází v makrofázích, dendritických buňkách, hepatocytech, alveolárních epitelových buňkách a extracelulárně v krvi infikovaných myši.¹

V dalších kapitolách bude popsána interakce *F. tularensis* s makrofágy a B buňkami.

2.2.1 Interakce *F. tularensis* s makrofágy, pasivní imunita

2.2.1.1 Interakce LPS *F. tularensis* s TLR-4 receptorem

Lipopolysacharid (LPS) gram-negativních bakterií tvoří hlavní složku vnější membrány. LPS se skládá ze tří strukturních částí. Jednou z těchto částí je lipid A, který je bioaktivní složkou LPS. LPS je také známý jako endotoxin, protože lipid A

navozuje silné prozátní tlivé odpovědi. U gram-negativních bakterií je LPS v tětinou rozpoznáný Toll-like receptorem (TLR) 4.

LPS *F. tularensis* má mnohem méně biologické aktivity než LPS z běžných stěvních bakterií. Není endotoxický, nespouští produkci zánětlivých mediátorů, jako je interleukin (IL) 1 a faktor nekrotizující nádory (TNF) ani z lidských, ani z myších buněk a nezpůsobuje proliferaci myších B buněk. Jako jednu z obvyklých biologických aktivit projevuje schopnost aktivovat komplementový systém. Jen LPS *F. novicida* projevuje částečnou schopnost stimulovat TNF- α , IL-12, a proliferaci lymfocytů. Bylo také prokázáno jeho působení při stimulaci tvorby oxidu dusnatého u krysích makrofágů.

K vzájemnému porovnání struktury lipidu A byly použity jak klinické izoláty, tak izoláty environmentální a to včetně typů *F. tularensis*. K analýze *in vitro* a *in vivo* aktivity byl použit vysoce purifikovaný a dobře charakterizovaný LPS *F. novicida*.

V další studii byly porovnány imunobiologické aktivity *F. novicida* LPS a LPS z *F. tularensis* LVS. Dále byla k pochopení role LPS v patogenezi *Francisella* infekce charakterizována infekce u myších souběhových bakterií *F. novicida*. Vě bylo zkoumáno na BALB/c ByJ myších.

K charakteristice LPS byl také použit LPS z *F. tularensis* LVS a srovnáván s vlastnostmi LPS *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium* LT2 a *Bordetella pertusis*. Byl zkoumán jejich účinek na různé typy myších.^{4,5,6}

TLR-4 receptor je prvek přenosu signálu u lipopolysacharidového receptorového komplexu. I když je TLR-4 důležitou molekulou vrozené imunity namířené proti dalším jiných gram-negativních bakterií, studie doposud ukázaly, že jeho potřeba k antibakteriální obraně, včetně *F. tularensis* LVS, závisí jak na typu patogenu, tak na cestě infekce. Příčina nedostatku působení TLR-4 v obraně hostitele proti *F. tularensis* by mohla souviset s jedinečnou strukturou a biologickými vlastnostmi *F. tularensis* LPS.

V případě *F. tularensis* jsou však rovněž imunitně důležité jiné TLR receptory - komplex TLR-2/TRL-1 a TRL-9. Ale ani tento kompenzační mechanismus není pravděpodobně optimální.

Tato fakta vyplývají, mimo jiné, z experimentů prováděných na TLR-4 defektních (TLR4^d) C3H/HeJ a TLR4^{+/+} C3H/HeOuj myších, kterým byly intradermálně podány různé dávky *F. tularensis* LVS.⁷

2.2.1.2 Receptor TLR-2

TLR receptory hrají významnou roli v přirozené imunitě. Rozpoznávají různé mikrobiální produkty jako například lipopolysacharid pomocí TLR-4 (viz. 2.2.1.1), flagelin TLR-5, a dvouvláknovou RNA TLR-3. Kromě toho studie ukázaly, že nedostatek TLR receptorů má za následek zvýšenou náchylnost k infekcím. Rozpoznávání mikrobiálních součástí těmito receptory vede k aktivaci různých cest přenosu signálu, které zprostředkovávají výslednou specifickou imunitní odpověď.

TLR receptory jsou primárně exprimovány na buňkách prezentujících antigen, jako jsou makrofágy a dendritické buňky. Rozpoznávání mikrobiálních produktů těmito receptory vede k aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), mitogen-aktivované protein kinázy a k indukci kostimulačních molekul. Schopnost TLR receptorů ovlivňovat produkci imunoregulačních cytokinů a modulovat expresi kostimulačních molekul ukazuje jejich rozhodující roli ve spojení vrozeného a adaptivního imunitního systému.

Prostřednictvím TLR-2 stimuluje *F. tularensis* LVS produkci prozánětlivého cytokinu TNF- α a zvýšenou regulaci exprese MHC třídy II, CD80, CD86, a CD40. Pozorována byla také jaderná translokace NF- κ B. Vzhledem k tomu, že jsou tyto molekuly rozhodující jak pro vrozenou imunitní odpověď, tak pro rozvoj antigen-specifické adaptivní imunitní odpovědi, jejich zvýšená exprese při stimulaci prostřednictvím TLR-2 naznačuje spojení mezi tímto TLR receptorem a adaptivní imunitou.

K těmto poznatkům vedla stimulace dendritických buněk odvozených z kostní dřeně C57BL/6 a TLR4^{-/-} myšič s flivou *F. tularensis* LVS.⁸

2.2.1.3 Aktivace Akt

Myší makrofágy infikované *F. tularensis* subsp. *novicida* indukují aktivaci Akt. Jedná se o serin/threonin kinázu, která pochází z plazmatické membrány bun k stimulovaných r znými podn ty, v etn r stových faktor a cytokin . Nutná je asociace její PH domény s fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátem (PIP₃), produktem enzymu PI3K. To vede k fosforylaci a aktivaci Akt.

Tato kináza hraje rozhodující role v rozmanitých bun ných procesech jako je regulace bun ného cyklu, p efití bu ky, genová transkripce závislá na NF- B, p estavba aktinu a migrace bu ky. Akt ovliv uje produkci prozán tlivých cytokin makrofágy infikovanými *F. novicida* prost ednictvím svého vlivu na NF- B. Zdá se, že Akt p sobí jako pozitivní, stejn jako negativní regulátor aktivace NF- B a produkce zán tlivých cytokin , v závislosti na povaze stimulu. Pokud jsou bu ky stimulované TNF- a r stovým faktorem produkovaným desti kami (PDGF), má Akt pozitivní regula ní efekt na aktivaci NF- B. V p ípad stimulae bun k lipopolysacharidem, p sobí Akt jako negativní regulátor aktivace NF- B a pozd j-í produkce prozán tlivých cytokin .

Akt podporuje produkci prozán tlivých cytokin v my-ích makrofázích infikovaných *F. novicida*. Mezi prozán tlivými cytokiny, které Akt pozitivn reguluje jsou IL-12, IL-6, TNF- , a IL-1 . Je zajímavé, že za stejných podmínek tlumí Akt produkci protizán tlivého cytokinu IL-10.⁹

2.2.1.4 Únik *F. tularensis* z fagozómu

F. tularensis LVS m že p eflívat *in vitro* v n kolika typech lidských i my-ích makrofág . P eflívá ve fagozómech t chto bun k. Bylo také publikováno, že tato bakterie vyfladuje pro intracelulární r st okyselenou vakuolu, protože p íjem fleleza je úsp -ný pouze za kyselých podmínek.

Brzy po internalizaci uniká *F. tularensis* LVS z fagozómu do cytoplazmy. I když p esný mechanismus tohoto úniku není znám, dané studie podporují hypotézu, že tento únik nastane jako výsledek degradace fagozomální membrány indukované

bakterií. To vyplývá ze zkoumání intracelulární lokalizace *F. tularensis* LVS v adherentních myších peritoneálních buňkách, v myších makrofág m-podobné buněčné linii J774A.1, a v lidské makrofágové buněčné linii THP-1.¹⁰

2.2.1.5. Autofágie *F. tularensis*

F. tularensis vstupuje do makrofág pomocí proces závislých na mikrofilamentech, zahrnujících ovinutí panoflkami. Velká vakuola obsahující *F. tularensis* (FCV) je velmi rychle přeměněna na kompaktní fagozóm, jehož zrání je ukončeno ve fázi pozdního endozómu po získání markerů Lamp 1 a Lamp 2. Tato pozdní endozomální FCV nezíská lysozomální markery a fagozomální membrána se postupně, 2-4 hodiny po infekci, rozpadá. To vede k úniku mikroba do cytoplazmy, kde se replikují. Množení bakterií je předpoklad pro indukci apoptotických procesů v infikovaných hostitelských buňkách, které začínají během 10-ti hodin po infekci. Indukce apoptózy je závislá na MAPK signální cestě.

Po uvolnění do cytoplazmy vstupuje *F. tularensis* do autofagozómů. Tento fenomén byl popsán také pro další intracelulární patogeny. Autofagozomy s *F. tularensis* získávají MHC II antigeny a pravděpodobně představují zdroj endogenních antigenů *F. tularensis* pro prezentaci CD4⁺ T lymfocytům. Tyto výsledky byly získány *in vitro* studií monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 infikované *F. tularensis* LVS.¹¹

2.2.1.6 Fenotypový profil infikovaných buněk

Zkoumáním interakce mezi *F. tularensis* LVS a myších buněčnou linií podobnou makrofág m J774.2 bylo zjištěno, že infikované buňky mají téměř stejný fenotypový profil jako neinfikované buňky. Díky tomuto nezmeněnému fenotypovému profilu se usuzuje, že infekce *F. tularensis* nemá za následek žádnou aktivaci hostitelských buněk. Základní rys *F. tularensis* infekce je interference s intracelulární signalizací a aktivací, hlavně lipopolysacharidem, méně významně interferonem (IFN- γ), což vede k zamezení fenotypových změn.¹²

2.2.2 Interakce *F. tularensis* s B bu kami

2.2.2.1 Úloha B bun k v infekci *F. tularensis*, asná odpov

Donedávna se B bu kám v pr b hu kontroly tularémie nep isuzovala významná role. V posledním desetiletí byly v-ak publikovány práce, ve kterých je prokázána úloha B bun k jak v asné, nespecifické imunit , tak v adaptivní imunit díky tvorbu specifických protilátek. asná ochrana proti *F. tularensis* LVS infekci je závislá na B bu kách. Tento obranný mechanismus, který limituje r st bakterií v orgánech retikuloendotelového systému velmi rychle po infekci vyřaduje p ítomnost IFN- , ale pravd podobn je na protilátkách nezávislý. Pravd podobn je zp soben produkcí rozpustného mediátoru B bu kami, který m fle p sobit lokáln nebo systémov . Bylo ukázáno, fle B bu ky sekretují množství rozpustných mediátor , v etn IL-4, IL-6, IL-10, TNF- , a IL-12, ale v t-inou ne IFN- . N které z t chto cytokin mohou sloužit k dal-í aktivaci bun k . D leflitými jsou IL-6, TNF- a a IL-12, které se ú astní regulace produkce IFN- a aktivace makrofág v mnoha intracelulárních infekcích, v etn LVS infekce. B bu ky mohou tyto cytokiny bu sami produkovat nebo poskytují mediátor, který napomáhá k produkci t chto cytokin ostatními bu kami imunitního systému.

Krom toho mohou B bu ky také fungovat v asné ochran prost ednictvím interakce bu ka-bu ka; nap íklad aktivované B bu ky indukují NK bu ky ke zvý-ené produkci IFN- prost ednictvím p ímého bun ného kontaktu.^{13, 14}

2.2.2.2 Úloha protilátek

Po mnoho desetiletí se p edpokládalo, fle mají protilátky pouze men-í, nebo fládnou, úlohu v ochran proti fakultativním a obligátn intracelulárním bakteriím a parazit m. V poslední dob v-ak n kolik experiment ukázalo, fle protilátky mohou zprost edkovat kriticky nutné funkce pro kontrolu intracelulárních infekcí.

V jednom z experiment byl pouflit kmen *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* subsp. *holarctica* získaný z klinických izolát . Úloha protilátek byla zkoumána na my-ích,

kteře byly deficitní na B buňky (C57BL/10). Při přenesení rozpustných protilátek do těchto myší, byla zaznamenána zvýšená rezistence k jinak smrtelné intraperitoneální dávce *F. tularensis* LVS. Tím byl v podstatě objeven obranný účinek protilátek na primární kořní infekci *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Další experimenty, s užitím *F. tularensis* LVS ke kořní infekci, poskytly první důkaz, že přítomnost patogen-specifických protilátek zvýhodňuje hostitele během infekce intracelulárním patogenem. Jedním z mechanismů, kterým patogen-specifické protilátky přispívají ke kontrole infekce *F. tularensis* může být spouštění kořní exprese TNF- α a IL-12. A tak tyto údaje potvrzují předchozí nálezy, že specifické protilátky hrají důležitou roli v získané imunitní odpovědi k tomuto prototypnímu intracelulárnímu patogenu. Zdá se však, že obranné protilátkami zprostředkované mechanismy byly užití minimálně nebo s fládným účinkem proti infekcím, které byly vyvolány vysoce virulentními kmeny *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Avšak přenos imunního séra proti klinickému izolátu *F. tularensis* subsp. *holarctica* u lidí hostiteli významnou ochranu.^{15, 16}

2.2.2.3 Primární interakce B buněk s *F. tularensis*

Obecně je klíčovou rolí B lymfocytů, v odpovědi adaptivní imunity, produkce specifických protilátek. B lymfocyty jsou schopné prezentovat antigen, produkovat přirozené imunoglobulin M (IgM) polyreaktivní protilátky, exprimovat TLR receptory, produkovat zánětlivé cytokiny a sekretovat faktory, které mohou přímo zprostředkovat destrukci mikrobů.

Důležitá úloha B lymfocytů v různých stádiích infekce nebyla dříve odhalena. Myslelo se, že B lymfocyty ani specifické protilátky nehrají fládnou důležitou roli v infekci *F. tularensis*. Ale nově se ukázalo, že jak ochranný účinek specifických protilátek, tak důležitá role B lymfocytů mají význam ve vrozené imunitě.

Bylo zjištěno, že je *F. tularensis* schopná napadnout B lymfocyty. Živá bakterie *F. tularensis* také dokáže vyvolat intracelulární signalizaci, která indukuje apoptózu B buněk. Tyto závěry vyplývají z experimentů prováděných *in vitro* na B buněčné linii myší (A20) a lidí (Ramos RA-1) a dále na primárních slezinných buňkách myší.

K této pokus byla uflita *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* FSC200. Bylo objeveno, že *F. tularensis* adhezuje na povrch B buněk a tyto buňky také napadá. Tato zjištění mohou být n výsvětlení, protože jsou B lymfocyty důležitě pro kontrolu velmi rané fáze infekce *F. tularensis*.

Obyčejně je apoptóza B lymfocytů zprostředkována B buněčným antigenním receptorem nebo CD95/Fas receptorem. Schopnost zapojit apoptotickou signální cestu má v B buňkách LPS. Ten je často rozpoznán TLR-4 receptorem, v případě B buněk TLR receptorem RP105 (CD180), při němž dojde k navození prozánětlivé odpovědi.

Jak již bylo uvedeno, infekce B buněk bakterií *F. tularensis* má za následek buněčnou smrt zprostředkovanou prostřednictvím apoptózy, avšak nemohou být vyloučeny ani alternativní formy buněčné smrti.¹⁷

2.3 B buňky

2.3.1 Charakteristika B buněk

Dříve byly B buňky považovány za součást adaptivního imunitního systému, specializující se pouze na tvorbu ochranných vysoce afinitních protilátek. Kromě toho vykazují další funkce jednotlivé podskupiny B buněk. Hlavní B-1 B buňky a B buňky marginální zóny (MZ), které se také účastní odpovědi vrozené imunity a mohou představovat most mezi odpověmi vrozené a adaptivní imunity. Vedle produkce protilátek hrají B buňky různé imunoregulační role díky své schopnosti prezentovat antigen a díky produkci cytokinů a chemokinů. Aktivace B buněk vrozenou imunitou může hrát důležitou úlohu prostřednictvím tvorby prozánětlivých reakujících protilátek, udržováním paměti B buněk a užitím imunomodulačních funkcí, které mohou poskytnout ochranu před autoimunitou. Na druhou stranu je také zřejmé, že aktivace autoreaktivních B buněk vrozenou imunitou má potenciál porušit toleranci a spustit autoimunitní odpověď.

Jsou identifikovány tři hlavní podskupiny periferních zralých B buněk u myší: B-1 buňky (rozdělené do B-1a, exprimující povrchovou CD5 molekulu, a B-1b, které ji neexprimují), B2 buňky (expresují CD19 molekuly) a MZ B buňky (expresují molekuly B220⁺CD1d^{high}CD21/35^{high}CD23^{low}). B2 buňky, také známé jako folikulární B buňky, jsou B buňky typické pro adaptivní imunitní systém. B-1 a MZ B buňky jsou lokalizovány ve specifických anatomických útvarech (peritoneální/pleurální dutiny a slezinné MZ) a jsou zodpovědné za časné protilátkové odpovědi. MZ B buňky, stejně jako B-1 buňky, jsou důležitými nejen pro boj s infekcemi, ale také k udržování homeostázy hostitele. Zdá se, že obě populace hrají důležitou úlohu v mikrobiálním dohledu, alespoň částečně v důsledku jejich anatomického umístění. Především MZ B buňky jsou ideálně vhodné k ochraně proti patogenům neseným krví. Bylo naznačeno, že se MZ B buňky účastní odpovědi proti opožděným bakteriím, nezávisle na T buňkách. Obě populace sdílejí tu vlastnost, že mohou být nezávislé na T buňkách a produkovat pirozené protilátky, které mohou poskytnout ochranné funkce v časné odpovědi k infekcím a autoimunitě.

Lidské B-1, B2 a MZ B buněčné podskupiny jsou dobře definovány v porovnání s myšími B buněčnými podskupinami.

Existuje jeden významný rozdíl mezi lidskou a myší populací. Je jím četnost paměťových B buněk periferní krve (PBL), která u lidí může představovat 40-60% všech PBL B buněk. Tento rozdíl byl způsoben akumulací dlouho žijících paměťových buněk během delší doby života lidí.¹⁸

2.3.2 Aktivace B buněk přes TLR, RP105 a CR

2.3.2.1 Aktivace přes TLR-4-Myd88 cestu

Zralé B buňky exprimují TLR-4 a TLR-2. Tyto receptory rozpoznávají mikrobiální produkty, čímž aktivují buňky (viz. 2.2.1.1. a 2.2.1.2).

B buňky mohou být aktivovány signalizací přes TLR-4-MyD88. Tato cesta aktivace B buněk byla sledována pomocí působení proteinu tepelného šoku o velikosti 60-kDa (HSP60). Bylo zjištěno, že rozpustný HSP60 indukoval, u naivních myší, proliferaci

B bun k a sekreci IL-10 a IL-6. B bu ky také zvý- en regulovali expresi MHC II a dal-ích povrchových molekul (CD69, CD40 a B7-2). Tímto se potvrdilo, že B bu ky mohou být aktivovány, mimo jiné, p es TLR-4-MyD88 cestu.¹⁹

2.3.2.2 Aktivace p es RP105

K aktivaci B bun k m že dojt p i stimulaci lipopolysacharidem. To vede k proliferaci a sekreci IgM.

B bu ky mají dva známé TLR receptory, které zprost edkují LPS signalizaci, TLR-4 a RP105 (CD180). RP105 je transmembránový protein typu I o velikosti 105-kDa. Prvn byl identifikován jako B bun ná povrchová molekula my-í, chránící B bu ky p ed apoptózou indukovanou ozá ením. RP105 je p ednostn exprimovaný na zralých B bu kách my-í a na B bu kách a dendritických bu kách lidí. Signalizaci p es tento receptor reguluje Lyn/CD19/Vav komplex.²⁰

2.3.2.3 Aktivace p es CR

CR (komplementový receptor), jako povrchová molekula B bun k, je schopný internalizovat antigen opsonizovaný C3 slofkami komplementu. Navázaný ligand je po internalizaci dopraven do bun ných oddíl obsahujících MHC molekuly t ídy II. Tato intracelulární signalizace má za následek prezentaci antigenu na povrchu B bun k a také aktivaci B bun k. Signalizace p es komplementový receptor je tedy dal-í cestou aktivace B bun k.²¹

2.3.3 B bu ky a bakterie

Mnoho intracelulárních bakterií (nap . *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* i *Francisella tularensis*) infikuje a zabíjí , vedle

makrofág a T lymfocyt, B lymfocyty. Infekce lymfocytů tímto patogenem nastane během rané fáze infekce.

K pochopení interakce B buněk s bakteriemi byly provedeny *in vitro* pokusy fakultativní intracelulární bakterie *Listeria monocytogenes* na lidských B lymfocytech (Ramos RA-1) a myších primárních B buňkách. *L. monocytogenes* způsobila úbytek povrchových molekul B buněk, tvorbu díř, nabobtnání buňky, poškození membrány a apoptózu. Další výzkum se zaměřil na zkoumání cytopatického efektu, tj. poškození membrány a povahu buněčné smrti indukované *Listeria monocytogenes* na myších hybridních B lymfocytech (Ped-2E9). Bylo zjištěno, že tvorba díř vede ke zvýšené permeabilitě membrány, ztrátě základních iontů a molekul a nakonec k buněčné smrti (apoptóze).

Tyto výsledky tedy ukazují, že B buňky a jejich sekretované produkty hrají významnou roli v kontrole infekce *Listeria* v hostiteli.^{22, 23}

2.4 Buněčné povrchové markery

2.4.1 Fenotypizační markery

Mezi fenotypizační buněčné markery se řadí molekuly CD19 a CD5.

CD19

Molekula CD19 se nachází na buněčném povrchu B buněčné linie. Jedná se o transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti (M_r) 95000, patří se do imunoglobulinové superrodiny. Je exprimován ranými pre-B buňkami od chvíle, kdy dojde k přeskupení genového setu imunoglobulinu až do diferenciace plazmocyty. Dále je exprimován folikulární dendritickými buňkami.

CD19 obsahuje dvě extracelulární domény podobné imunoglobulinovým, doménu sahající do membrány a cytoplazmatický konec o délce asi 240 aminokyselin s devíti tyrozinovými zbytky, což jsou potenciální místa fosforylace. Tyto strukturní rysy přispívají molekule CD19 ke schopnosti signalizace. Zprostředkovává přenos signálu

zahajujícího složitý sled biologických odpovědí, které mají pravděpodobně hlavní význam pro signalizaci B buněk a/nebo regulaci růstu a rozvoj odpovědi humorální imunity. Po připojení se spojuje CD19 s protein tyrosin-kinázami Lyn a Fyn a jsou zahájeny dráhy signalizace přes Vav/Ras/mitogen aktivovanou protein kinázu a fosfatidylinositol-3 kinázu. Aktivována je také fosfolipáza C β , což vede k tvorbě inositol trifosfátu a k mobilizaci vápenatých iontů (Ca^{2+}).

Na zralých B buňkách je molekula CD19, *in vitro* a *in vivo*, spojena s těmi odlišnými molekulami a tvoří tetrametrický komplex: CD21 (CR2, C3d/receptor viru Epstein-Barrové), CD81 (TAPA-1), a Leu-13. Díky tomuto spojení je molekula CD19 považována za přenosce signálu pro komplementový receptor 2 (CR2). Ten nemusí mít skutečné signální vlastnosti, protože má krátkou cytoplazmatickou doménu. CD19 se může navíc připojovat s antigenem specifickým receptorem B lymfocytů (BCR).

Molekula CD19 má také význam jako kostimulátor B lymfocytů.^{24, 25, 26}

CD5

Molekula CD5 se objevuje na T buňkách v různých vývojových stádiích, v hojném množství je exprimována na všech zralých T buňkách. Nachází se také na subpopulaci peritoneálních B buněk, označovaných jako B-1a buňky. Počet B-1a buněk je zvýšen při některých autoimunitních onemocněních a jsou spojeny s tvorbou autoprotilátek.

CD5 je povrchový glykoprotein o molekulové hmotnosti 67 kDa. Je členem do rodiny scavengerového (šuklízecího) receptoru bohatého na cystein (SRCR). Podle biochemických studií je molekula CD5 spojena s CD3 v komplexu T-buněčného receptoru (TCR)-CD3, dále je spojen s komplexem B-buněčného receptoru (BCR). Signály, které pocházejí z komplexu TCR-CD3 samostatně simulují vnitřní tok vápníku, krátkodobý tok inositol fosfátu a krátkodobou serin kinázovou aktivitu spojenou s CD5.

Struktura obsahuje molekula CD5 tři extracelulární SRCR domény, hydrofobní transmembránovou oblast a velkou cytoplazmatickou doménu, která má čtyři tyrozinové zbytky a několik předpokládaných míst pro fosforylaci serin/threonin.

Ve srovnání s normálními B-1a buňkami, překřížení imunoglobulinu M (IgM) na CD5 deficitních B-1a buňkách indukuje zvýšenou mobilizaci Ca^{2+} , proliferaci a rezistenci k apoptóze buněk vstupujících do buněčného cyklu. Za určitých okolností působí CD5 jako negativní regulátor buněčných aktivit.^{27, 28, 29}

2.4.2 Aktivační markery

K aktivním buněčným markerům patří molekuly CD54, CD69, CD86, CD95, MHC II a CD11b/CD18.

CD54 (ICAM-1)

ICAM-1 (intercelulární adhezivní molekula-1), označovaná také jako CD54, patří do imunoglobulinové superrodiny adhezivních molekul. Jedná se o transmembránový glykoprotein, který obsahuje pět extracelulárních domén a krátký cytoplazmatický konec. Na normálních endoteliálních buňkách je tato molekula exprimována jen v nízkých hladinách. Její exprese na endoteliálních buňkách se zvyšuje při odpovědi na zánětlivé cytokiny jako je TNF- α , IL-1 a IFN- γ . Při akutních a chronických zánětlivých onemocněních se endoteliální buňky aktivují a exprimují vysoké hladiny ICAM-1, a navíc vaskulární buněčnou adhezivní molekulu-1 (VCAM-1) a E-selektin.

ICAM-1 interaguje s receptorem na leukocytech, lymfocytovým funkčním asociovaným antigenem-1 (LFA-1), a s makrofágovým antigenem-1 (Mac-1), což je klíčové pro adhezi leukocytů a transendoteliální migraci. Po obsazení ICAM-1 se spustí zvýšení volného intracelulárního Ca^{2+} , kontraktilita myozinu, aktivace p38 kinázy a malých guanozin trifosfatáz, zejména členů Rho rodiny a tyrosin kinázy $p60^{Src}$. Aktivace těchto signálních cest má za následek přestavbu cytoskeletu, což přispívá ke zvýšení kontraktility a funkci endoteliálních buněk, eventuálně usnadňuje diapedézu leukocytů.^{30, 31, 32}

CD69

CD69 je nejčasněji aktivní buněčný povrchový receptor, který se nachází na leukocytech. Jedná se o lektin C-typu. CD69 je konstitutivně exprimovaný krevními destičkami, zralými thymocyty a dále myeloidními a lymfoidními prekurzory kostní dřeně. Neobjevuje se na lymfocytech periferní krve, ale je exprimovaný subpopulacemi T a B buněk v periferních lymfatických tkáních.

Exprese CD69 na leukocytech je indukována cytokiny. Na přirozeně cytotoxických (NK) buňkách je exprese CD69 indukována prostřednictvím IL-2, IFN- γ , prokřídlením Fc RIII. Kromě toho stimulace aktivovaných NK buněk anti-CD69 protilátkami stimuluje cytolytickou aktivitu.³³

CD86 (B7-2)

Molekula CD86, označovaná také jako B7-2, se vyskytuje na povrchu buněk prezentujících antigen (APC) jako jsou dendritické buňky, makrofágy a B buňky. Jeho exprese je omezena převážně na krvetvorné buňky. Na buněčných površích je přítomný jako monomer. Jedná se o transmembránový glykoprotein typu I, který obsahuje membránovou distální IgV a membránovou proximální IgC doménu.

CD86 je ligand, který interaguje s kostimulačními receptory CD28 a cytotoxickým s T-lymfocytům spojeným antigenem 4 (CTLA-4), které jsou exprimovány na T buňkách. Tyto interakce jsou rozhodující pro správnou regulaci aktivity T buněk. Afinita CD86 k CTLA-4 je údajně nižší než k CD28.

Tato molekula hraje základní roli v sekreci IL-4 a zvyšuje celkové odpovědi T-pomocných buněk typu 2 (Th2). Prokřídlení CD86 zvyšuje regulaci B buněk pro proliferaci, zvyšuje expresi antiapoptotické molekuly Bcl-xL a stimuluje produkci IgG1, IgG2a a IgE.^{34, 35, 36}

CD95

CD95 (APO-1/Fas) je buněčný povrchový smrtící receptor, který indukuje apoptózu. Patří k superrodině TNF-receptorů. Kontroluje homeostázu mnoha tkání a má rozhodující roli v kontrole imunitní odpovědi a potlačení nádoru. Interakce s jeho

ligandem, CD95L (CD178/FasL), hraje klíčovou úlohu v regulaci periferní tolerance a lymfoidní homeostázy.

Tento receptor nese úsek 80-ti aminokyselin v cytoplazmatickém konci, který je známý jako smrtící doména (DD). Ta je nezbytná pro zahájení apoptózy. Při vazbě svého ligandu sestavuje CD95 smrt-indukující signální komplex (DISC) složený z molekuly FADD, prokaspázy-8, prokaspázy-10 a z kaspázy-8/10 regulátoru c-FLIP.^{37, 38, 39, 40}

MHC II (I-A)

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) molekul třídy II hraje klíčovou roli ve vývoji specifických imunitních odpovědí proti patogenům. Jsou zodpovědné za prezentaci peptidových antigenů pocházejících z exogenních proteinů T bučkám. Cizí antigeny jsou fagocytovány a zpracovány do malých peptidů. Ty jsou následně zavedeny do komplexu MHC třídy II a exportovány na buněčný povrch. Teprve pak jsou tyto antigeny rozpoznány CD4⁺ T bučkami. Nedostatek exprese molekul třídy II vede k těmto imundeficiencím, zatímco abnormální exprese může způsobit autoimunitní onemocnění. Proto je klíčovým bodem v kontrole a udržování imunitní odpovědi regulace exprese MHC II antigenů.

MHC proteiny třídy II jsou exprimované na antigen prezentujících bučkách, které zahrnují monocyty, makrofágy, dendritické bučky a B bučky. Nachází se také na thymových epiteliálních bučkách a gliových bučkách. Klasické MHC proteiny II třídy, HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP, jsou téměř vždy exprimované souasně na povrchu antigen prezentujících buněk. Neklasické molekuly, HLA-DM, HLA-DO, a invariantní řetězec (Ii), jsou exprimované uvnitř antigen prezentujících buněk a upravují cestu prezentace antigenu.

Všechny klasické i neklasické proteiny třídy II, kromě monomerního Ii, se skládají z α a β peptidových řetězců kódovaných odlišnými A a B geny. Tyto geny se nachází na chromozomu 6.^{41, 42}

CD11b/CD18

CD11b/CD18 (CR3, Mac-1) je hlavní α 2 integrin exprimovaný na neutrofilech, který zastává významné funkce v imunitě a zánětu. Jedná se o adhezivní molekulu, která hraje klíčovou roli při pevném připojení cirkulujících leukocytů, zejména neutrofilů, k cévnímu endotelu, stejně jako v transendoteliální migraci do tkání. Ty jsou známy zejména při zánětlivých onemocněních.

Pro zánětlivé úinky zprostředkované tímto adhezivním receptorem jsou zahájeny při vazbě ligandu. Interakce receptor-ligand vyžaduje, aby se receptor změnil z nízkofinitního do vysoko-afinitního stavu, který je schopný vazby ligandu. Mezi ligandy schopné vazby k molekule CD11b/CD18 patří například intercelulární adhezivní molekula 1 (ICAM-1), C3 komplementový fragment iC3b, fibrinogen, heparin, elastáza neutrofilů, inhibiční faktor neutrofilů a fukoidin. CD11b/CD18 také interaguje s několika plazmatickými proteiny a cévními endoteliálními buněčnými receptory. Příkladem je kininogen o vysoké molekulové hmotnosti, faktor X, komplementový faktor H nebo E-selektin.^{43, 44, 45}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ÁST

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Bakterie a buňky

Francisella tularensis FSC200 (FOI Umea, TMŠvédsko)

Buňky - slezinné a peritoneální z Balb/c myši (Velas, Praha). Balb/c myši jsou geneticky citlivé k *F. tularensis*

3.1.2 Média, roztoky a chemikálie

Deionizovaná voda

Fyziologický roztok

Kultivační médium RPMI + 10% séra (Gipco)

Kultivační pevné podlahy McLeod

PBS (laboratorní si připravuje sama)

Roztok k lyzování erytrocytů EasyLyse (Dako)

Roztok k promývání buněk Cell Wash (PBS + azid + fletatina)

Trypanová mod

3.1.3 Protilátky pro průtokovou cytometrii

anti-I-A_d-FITC (fluorescein izothiokyanát) k FITC anti-mouse I-A^d (BD Pharmingen, kat. . 553547)

anti-CD5-APC k APC (allophycocyan) anti-mouse CD5 (BD Pharmingen, kat. . 550035)

anti-CD11b-FITC k rat anti-mouse CD11b (Serotec, kat. . MCA74F)

anti-CD19-PE (phycoerythrin) ó PE rat anti-mouse CD19 (BD Pharmingen, kat. . 553786)
anti-CD54-FITC ó FITC anti-mouse CD54 (BD Pharmingen, kat. . 553252)
anti-CD69-FITC ó FITC anti-mouse CD69 (BD Pharmingen, kat. . 557392)
anti-CD86-FITC ó FITC rat anti-mouse CD86 (BD Pharmingen, kat. . 553691)
anti-CD95-FITC ó FITC mouse anti-human CD95 (BD Pharmingen, kat. . 550042)

3.1.4 P ístroje a pom cky

Bakteriální kli ky (Gamma)
Bakteriální hokejky
Bürkerova kom rka (Meopta)
Centrifuga BR4i (Jouan)
Centrifuga CR312 (Jouan)
Denzitometr CO 8000 (WPA Bioware)
Flow box Safeflow1.2 (Bioair Instruments)
Injek ní st íka ky
Kádinky
Kultiva ní láhve (TPP)
Mikroskop sv telný (Carl Zeiss Jena)
Mikrozkumavky s ví kem 1.5 ml šependorfkyõ (Eppendorf)
Petriho misky (TPP)
Pipety automatické 10 l, 20 l, 200 l, 1000 l (Eppendorf)
Pipety 5ml, 10ml (TPP)
Pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann laborgerate)
Pr tokový cytometr Cyan_{ADP} (Dako Cytomation)
Rukavice latexové (Sempercare)
Software pro analýzu na pr tokovém cytometru Summit Software 4.3
Stojan na ependorfky
Stojan na zkumavky
Sítko

Tržní ky (Eppendorf)
Termostatka MS2 (IKA)
Zkumavky polystyrenové 5 ml (BD Falcon)
Zkumavka PS sterilní 15 ml (Gamma Group)
Zkumavky pro centrifugaci 14 ml, 50 ml (TPP)
Zkumavky pro protokovou cytometrii

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Kultivace bakteriálních buněk

Z masivně nakořované plotny McLeod jsme, ve flow boxu, odebrali bakteriální kulturu polovinu narostlé bakteriální kultury. Tu jsme masivně a rovnoměrně nakořovali na novou plotnu McLeod. Druhou polovinu bakteriální kultury jsme stejným způsobem nakořovali na druhou plotnu. Obě plotny jsme vlořili do termostatu a inkubovali 24 hodin při 37 °C.

3.2.2 Příprava bakteriální suspenze

Připravili jsme dvě zkumavky PS. Do každé jsme napipetovali 4 ml PBS. Jedna byla použita pro přípravu bakteriální suspenze, druhá jako srovnávací roztok (blank) pro měření optické denzity (O.D.).

K přípravě bakteriální suspenze jsme použili 24 hodinovou bakteriální kulturu připravenou viz. 3.2.1. Ve flow boxu jsme bakteriální kulturu setřeli z plotny část narostlé kultury. Kulturu jsme otřeli o suchou stěnu zkumavky určené pro přípravu suspenze. Kulturu se suspenzí jsme otřeli tak, aby na stěně nezůstaly žádné shluky bakterií. Poté jsme kulturu namočili v obsahu zkumavky a bakteriální suspenzi jsme postupně smýřli ze stěny zkumavky do PBS. Zkumavku s bakteriální suspenzí jsme protřepali a vlořili do denzitometru k měření O.D..

Optickou denzitu jsme proměřovali v 1 ml PBS ve druhé zkumavce. Postup jsme opakovali, dokud O.D. nedosáhla hodnoty přibližně 1.0. To odpovídá koncentraci 5×10^9 bakterií v 1 ml PBS.

Takto připravená bakteriální suspenze byla dále použita pro výsev a odečet CFU (viz. 3.2.3).

Bakteriální suspenze byla také použita pro *in vivo* a *ex vivo* infekce.

V případě *in vivo* infekce myši Balb/c byla suspenze připravena ve fyziologickém roztoku a aplikována intraperitoneálně v dávce 10^2 mikrob na myš v objemu 0.2 ml.

V případě *ex vivo* infekce peritoneálních buněk byl na celkový objem bakteriální suspenze vypočítán celkový počet bakterií potřebný pro infekci. Bakteriální suspenze připravená v RPMI médiu s 10% séra byla v množství 500 l (MOI = 500) pipetována do každé kultivační láhve k suspenzi peritoneálních buněk.

3.2.3 Výsev a odečet CFU

Do stojánku jsme připravili 7 zkumavek o objemu 1.5 ml, které jsme označili 10^{-1} až 10^{-7} . Do každé jsme napipetovali 450 l PBS. Z bakteriální suspenze s O.D. přibližně 1 (příprava viz. 3.2.2) jsme odebrali 50 l a pipetou přenesli do ependorfy označené 10^{-1} . Novou pipetou jsme nejprve suspenzi promíchali a poté odebrali 50 l a přenesli do ependorfy s označením 10^{-2} . Takto jsme pokračovali v celé řadě, čímž jsme docílili řady desítkovou řadou. Z poslední ependorfy, označené 10^{-7} , jsme odebrali 50 l suspenze, kterou jsme pipetovali na suchou plotnu McLeod. Suspenzi jsme roztírali sterilní bakteriální hokejkou po celé plotně, dokud se suspenze nevsákla. Takto jsme bakterie vyseli v duplicitě, spotřebovali jsme tedy 2 plotny McLeod. Každou označenou plotnu jsme vlořili do termostatu, kde se inkubovaly v inkubátoru při 37 °C, dokud nedošlo k nárůstu bakteriálních kolonií. Poté jsme vřchny kolonie, narostlé na každé plotně, spočítali. Koncentraci kolonií v 1 ml bakteriální suspenze jsme vypočítali podle následujícího vzorce:

$$CFU = \text{průměrný počet kolonií} \times \text{ední l} \times \text{ední 2}$$

ed ní 1: ed ní p vodního vzorku (nap . 10^7)

ed ní 2: $1000 \cdot 1/50 \cdot 1 = 20$

3.2.4 Ur ení po tu a fivotnosti bun k

Z prot epané bun né suspenze jsme odpipetovali 10^{-1} l, které jsme smíchali s 10^{-1} l trypanové mod i. Tuto sm s jsme napipetovali pod krycí sklí ko Bürkerovy kom rky, která sloufí k po ítání bun k. Bürkerovu kom rku jsme vlofili pod sv telný mikroskop. Ve 25 tvercích jsme po ítali bu ky, které se nacházely jak uvnit každého tverce, tak bu ky dotýkající se dvou stran každého tverce. Po ítali jsme fivé i mrtvé bu ky. Mrtvé bu ky na rozdíl od fivých (šzá ícíchõ) byly zbarveny mod e.

Ur ení po tu bun k

Po et bun k v 1 ml suspenze jsme vypo ítali podle následujícího vzorce:

celkový po et fivých bun k ve 25-ti tvercích \times ed ní trypanovou mod í \times koeficient Bürkerovy kom rky

ed ní trypanovou mod í: 2

koeficient Bürkerovy kom rky: 10000

Ur ení fivotnosti bun k

Po et fivých bun k jsme vyd lili po tem v–ech bun k (sou et fivých a mrtvých bun k). Vypo ítané íslo jsme vynásobili íslící 100 a získali jsme fivotnost v %.

3.2.5 Příprava buněčné suspenze

3.2.5.1 Příprava suspenze slezinných buněk po *in vivo* infekci

Sleziny vypreparované z *in vivo* infikovaných myší a z kontrolních myší (myší neinfikovaných) jsme uložili na Petriho misky do kultivačního média. Sleziny jsme pomocí pístu injekční stříkačky drtili přes jemné sítko a vznikla buněčná suspenze. Suspenze jsme pipetovali do centrifugačních zkumavek a doplnili RPMI médiem se sérem na objem 2 ml. Každou slezinu jsme zpracovali zvlášť, suspenze jsme nemíchali. Suspenze s médiem jsme protřepali a centrifugovali 7 minut při 1400 rpm a 4 °C. Supernatant jsme odstranili a pelet resuspendovali. Pak jsme buňky 3x promyli v PBS. To znamená, že jsme k resuspendovaným buňkám přidali 2 ml PBS, protřepali a provedli centrifugaci opět 7 minut při 1400 rpm a 4 °C. Tento krok jsme 3x zopakovali. Pak jsme provedli lyzování erytrocytů (viz. 3.2.6). Po lyzování erytrocytů jsme určili počet a životnost lymfocytů (viz. 3.2.4). Nakonec jsme buňky načetli na koncentraci 5×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Takto jsme buňky připravili na značení pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorofory (viz. 7.2.3).

3.2.5.2 Příprava suspenze peritoneálních buněk po *in vivo* infekci

Peritoneální buňky, odebrané z infikovaných i kontrolních myší do centrifugačních zkumavek, jsme doplnili PBS roztokem na objem 8 ml v každé zkumavce. Suspenzi buněk jsme centrifugovali 7 minut při 1400 rpm a 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali a doplnili PBS roztokem na objem 4 ml. Opět jsme centrifugovali a celý postup opakovali. Takto jsme buňky promyli 3x. Pokud suspenze buněk obsahovaly erytrocyty, provedli jsme jako následující krok lyzování erytrocytů (viz. 3.2.6). Následně jsme buňky 2x promyli v Cell Wash a určili jsme počet a životnost lymfocytů (viz. 3.2.4). Suspenzi buněk jsme načetli na koncentraci 5×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Takto jsme buňky připravili na značení pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorofory (viz. 7.2.3).

3.2.5.3 Příprava suspenze peritoneálních buněk po *ex vivo* infekci

Po izolaci byly peritoneální buňky připraveny k *ex vivo* infekci. Suspenze buněk byly pipetovány do kultivačních láhví. Buňky v kultivačních láhvích, označené jako kontrola, infikovány nebyly. Zbylé suspenze buněk byly *ex vivo* infikovány *F. tularensis* FSC200. Inkubace probíhala v termostatu 24, 48 a 72 hodin při 37 °C / 5 % CO₂. Takto byly buňky připraveny paní laborantkou.

Po 24 hodinové inkubaci jsme připravili kontrolní i infikované buňky ke značení protilátkami následujícím postupem. Suspenze buněk v kultivačních láhvích jsme roztřepali a pipetovali do centrifugačních zkumavek. Centrifugovali jsme 10 minut při 1300 rpm a 4 °C. Supernatant jsme odstranili a pelet resuspendovali. Ke každé buněčné suspenzi jsme přidali 4 ml PBS. Opět jsme centrifugovali, odstranili supernatant a pelet opět roztřepali a přidali 4 ml PBS. Pak jsme určili počet a fluvotnost lymfocytů (viz. 3.2.4). Suspenzi buněk jsme naředili na koncentraci 2×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Takto jsme buňky připravili na značení pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorofory (viz. 7.2.3). Stejně jsme postupovali při přípravě buněk po 48 a 72 hodinové inkubaci.

3.2.6 Lyzování erytrocytů

Po posledním promytí buněk v PBS (viz. 3.2.5.1) jsme odstranili supernatant a pelet resuspendovali. Ke každé buněčné suspenzi jsme přidali 4 ml 20x zředěného lyzačního činidla EasyLyse. Za stálého míchání jsme inkubovali při pokojové teplotě 5 minut. Po inkubaci jsme do každé zkumavky přidali 4 ml RPMI média pro zastavení lyzování erytrocytů. Centrifugovali jsme 7 minut při 1400 rpm a 4 °C. Supernatant jsme odstranili a pelet resuspendovali. Ke suspenzi buněk jsme přidali 2 ml Cell Wash. Buňky jsme v Cell Wash 2x promyli. Po posledním promytí jsme opět supernatant odstranili, pelet resuspendovali a do každé zkumavky přidali 2 ml Cell Wash.

3.2.7 Zna ení bun k monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorofory

P ipravené a na ed né bu ky na pofladované koncentrace jsme ádn prot epali a rozpipetovali do polystyrénových zkumavek vřdy v mnořství 100 l bun né suspenze na 1 zkumavku. K bu kám jsme p idali protilátky konjugované s fluorofory podle schémat (viz. tabulka 1, tabulka 2, tabulka 3). Bu ky s protilátkami jsme prot epali a inkubovali 20 minut ve tm p i pokojové teplot (pop . 30 minut na ledu). Po inkubaci jsme do kařdé zkumavky p idali 1 ml Cell Wash, prot epali a centrifugovali 7 minut p i 1400 rpm a 4 °C. Supernatant jsme odstranili, pelet resuspendovali a p idali 1 ml Cell Wash. Op t jsme centrifugovali za stejných podmínek, stejnou dobu. Po odstran ní supernatantu a resuspendování bun k jsme do kařdé zkumavky pipetovali 0.5 ml Cell Wash. Celý obsah zkumavek jsme p epipetovali do malých zkumavek ur ených pro pr tokovou cytometrii. Tímto postupem jsme bu ky p ipravili k analýze na pr tokovém cytometru. (viz. 3.2.8).

Tabulka I Schéma zna ení slezinných bun k protilátkami

Ozna ení vzorku	Protilátka	Mnořství (l)	Protilátka	Mnořství (l)
K	bez barvení		bez barvení	
S1	I-A _d -FITC	1	CD19-PE	1
S2	I-A _d -FITC	1	CD19-PE	1
S3	I-A _d -FITC	1	CD19-PE	0.5
S4	CD69-FITC	1	CD19-PE	1
S5	CD69-FITC	1	CD19-PE	1
S6	CD69-FITC	1	CD19-PE	0.5
S7	CD54-FITC	1	CD19-PE	1
S8	CD54-FITC	1	CD19-PE	1
S9	CD54-FITC	1	CD19-PE	0.5
S10	CD86-FITC	1	CD19-PE	1
S11	CD86-FITC	1	CD19-PE	1
S12	CD86-FITC	1	CD19-PE	0.5

K ó kontrolní neinfikované buňky

S1, S4, S7, S10 ó infikované slezinné buňky z myši . 1

S2, S5, S8, S11 ó infikované slezinné buňky z myši . 2

S3, S6, S9, S12 ó infikované slezinné buňky z myši . 3

Tabulka II Schéma značení peritoneálních buněk protilátkami po *in vivo* infekci

Značení vzorku	Protilátka	Množství (l)	Protilátka	Množství (l)	Protilátka	Množství (l)
KK	bez barvení		bez barvení		bez barvení	
K1	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD11b-FITC	1
K2	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	I-A _d -FITC	1
K3	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD69-FITC	1
K4	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD54-FITC	1
K5	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD86-FITC	1
K6	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD95-FITC	1
IK	bez barvení		bez barvení		bez barvení	
I1	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD11b-FITC	1
I2	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	I-A _d -FITC	1
I3	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD69-FITC	1
I4	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD54-FITC	1
I5	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD86-FITC	1
I6	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD95-FITC	1

K ó kontrolní neinfikované buňky

I ó infikované buňky

Tabulka III Schéma zna ení peritoneálních bun k protilátkami po *ex vivo* infekci

Zna ení vzorku	Protilátka	Mno0ství (l)	Protilátka	Mno0ství (l)	Protilátka	Mno0ství (l)
KK	bez barvení		bez barvení		bez barvení	
K1	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD11b-FITC	1
K2	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	I-A _d -FITC	1
K3	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD69-FITC	1
K4	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD54-FITC	1
K5	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD86-FITC	1
K6	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD95-FITC	1
IK	bez barvení		bez barvení		bez barvení	
I1	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD11b-FITC	1
I2	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	I-A _d -FITC	1
I3	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD69-FITC	1
I4	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD54-FITC	1
I5	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD86-FITC	1
I6	CD5-APC	1	CD19-PE	0.5	CD95-FITC	1

K ó kontrolní neinfikované bu ky

I ó infikované bu ky

3.2.8 Analýza bun k pomocí pr tokové cytometrie

Pr toková cytometrie (FCM) je technika umofl ující kvantitativn analyzovat velké množství ástic (nap . bun k) v suspenzi. Na základ r zných p esn definovaných parametr pak tato metoda dovoluje cílen separovat ástice (bu ky) spl ující pofadované parametry. Parametrem pr tokové cytometrie m fle být fyzikální nebo chemická vlastnost bu ky (nap . granularita, obsah DNA, flivotnost, pH) a v-e co

m ěme ozna it monoklonální protilátkou (povrchové molekuly diferenčních antigenů, intracelulární molekuly včetně cytokinů atd.).

V průtokové cytometrii se měří elní rozptyl světla (FSC – forward scatter) úm rný velikosti buněk, bo ní rozptyl světla pod úhlem 90° (SSC – side scatter) odrážející vnit ní komplexitu buněk, intenzita fluorescence emitované aplikovanými fluorescenčními sondami, tvar a čas trvání světelného pulsu (rozptylu světla, fluorescence). K měn ě těchto parametrů dochází během průchodu buněk laserovým paprskem průtokového cytometru.⁴⁶

Bu ky jsme analyzovali na průtokovém cytometru Cyan_{ADP} v programu Summit Software 4.3. Nam ěná data jsme zpracovali v programu Microsoft PowerPoint. Grafy charakterizující změny povrchových markerů B buněk jsme zpracovali v programu Microsoft Excel.

3.2.8.1 Postup při analýze dat z průtokové cytometrie

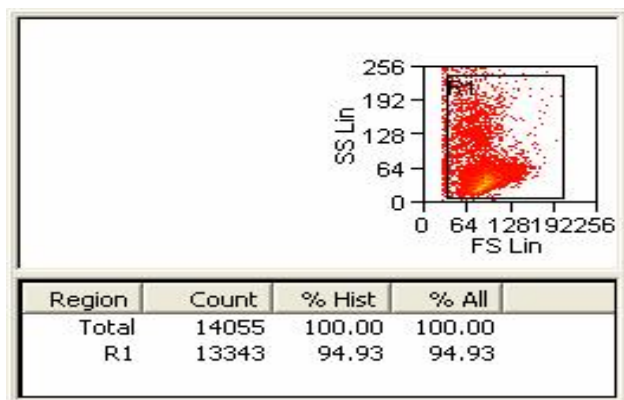
Z diagramu vzájemné závislosti dvou rozptylových parametrů, SSC a FSC, jsme vybrali populaci buněk, kterou jsme dále analyzovali. Vybraná populace buněk určená k další analýze se nacházela v bloku R1 (Obr. 1).

Vybranou populaci buněk jsme dále analyzovali v diagramu znázorujícím profil exprese CD19-PE versus CD5-APC. Populace CD19⁺ B buněk se nacházela v bloku R6, CD5⁺ B bu ky v bloku R7 (Obr. 2).

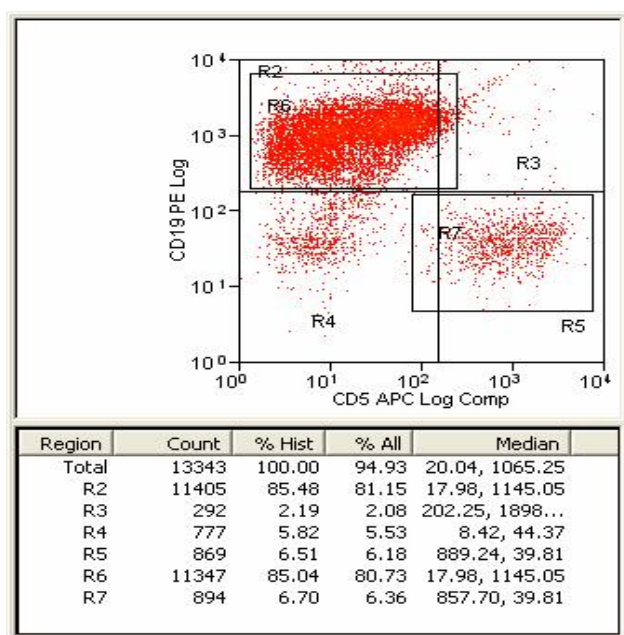
Dále jsme jednotliv ě analyzovali populaci CD19⁺ B buněk (z bloku R6) a CD5⁺ B buněk (z bloku R7). Analýzou každé populace jsme získali diagram, který ur uje MFI (median fluorescence intensity) aktivní molekuly (např. CD54). A to pro každou populaci zvlá ě (Obr. 3 a 4). Tímto způsobem jsme zhodnotili všechna nam ěná data.

Změny v expresi povrchových molekul jsme hodnotili na základ ě hodnot MFI všech buněk. Srovnávali jsme hodnoty infikovaných buněk po 24, 48 a 72 hodinách

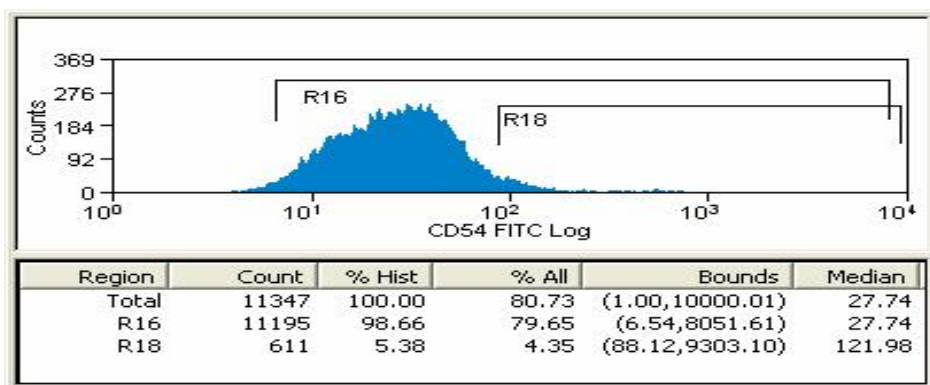
s hodnotami kontrolních buněk. Signifikanci nárůstu a poklesu exprese povrchových molekul jsme hodnotili Studentovým t-testem.



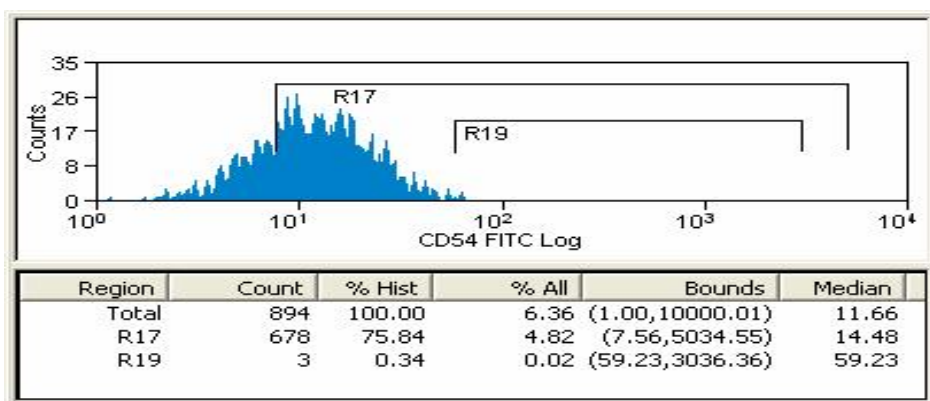
Obr. 1: Diagram závislosti SS versus FS



Obr. 2: Diagram profilu exprese CD19-PE versus CD5-APC



Obr. 3: Diagram po tu CD19 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI



Obr. 4: Diagram po tu CD5 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI

4. VÝSLEDKY

4.1 Změny v povrchových molekulách peritoneálních B buněk po *in vivo* infekci *F. tularensis* FSC200, 24, 48 a 72 hodin

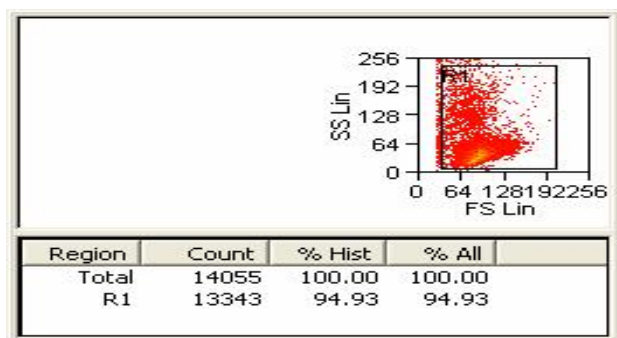
Z myši Balb/c, infikovaných *in vivo* *F. tularensis* FCS200, jsme peritoneálním výplachem získali peritoneální buňky. Připravili jsme buňkovou suspenzi o koncentraci 5×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Buňky jsme označili monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorescencí. Pak jsme provedli analýzu pomocí průtokového cytometru. Výsledky z průtokového cytometru jsme vyhodnotili v programu Microsoft PowerPoint. Získaná data jsme nakonec zpracovali v grafech v programu Microsoft Excel.

Změny v expresi povrchových molekul jsme hodnotili na základě hodnot MFI (median fluorescence intensity). Srovnávali jsme hodnoty infikovaných buněk po 24, 48 a 72 hodinách s hodnotami kontrolních buněk. Signifikanci nárůstu i poklesu exprese povrchových molekul jsme hodnotili T-testem.

Postup hodnocení dat získaných průtokovou cytometrií

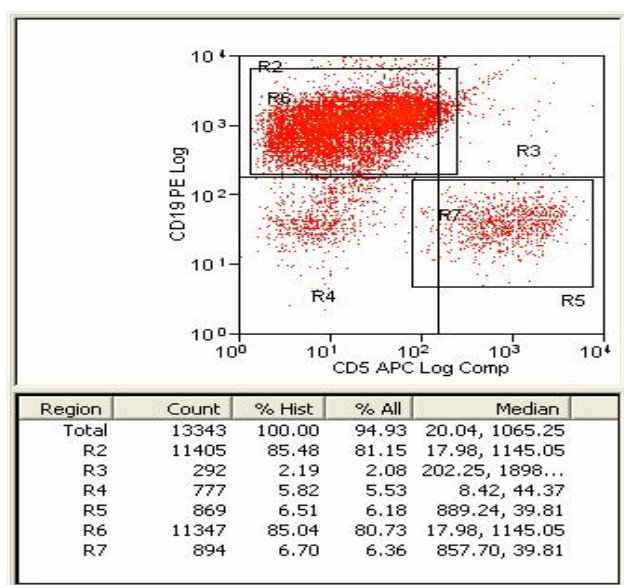
Data získaná měřením na průtokovém cytometru CyanADP v programu Summit Software 4.3 jsme dále analyzovali v programu Microsoft PowerPoint. Tento postup ukazujeme na příkladu analýzy pro molekulu CD54 s originálními diagramy.

Nejprve jsme zanalyzovali kontrolní (neinfikované) buňky. Z diagramu vzájemné závislosti dvou rozptylových parametrů, SSC a FSC, jsme vybrali populaci buněk, kterou jsme dále analyzovali. Vybraná populace buněk určená k další analýze se nacházela v bloku R1 (Obr. 5).



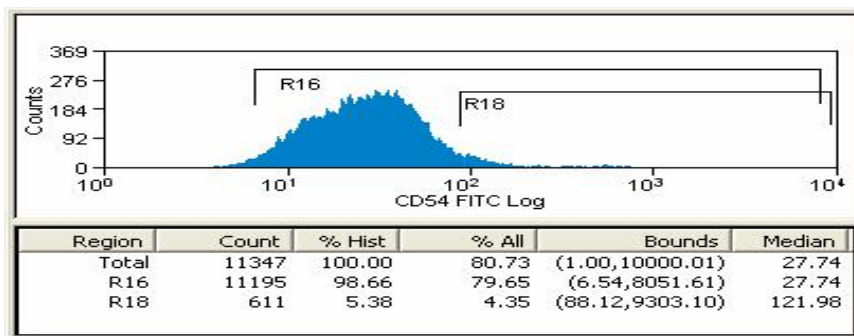
Obr. 5: Diagram závislosti SS versus FS, kontrola 24 hodin

Populaci bun k vymezenou v bloku R1 jsme dále analyzovali v diagramu znázorujícím profil exprese CD19-PE versus CD5-APC. Populace CD19 B bun k (85.04 % bun k z bloku R1) se nacházela v bloku R6, CD5 B bu ky (6.07 % bun k z R1) v bloku R7 (Obr. 6).



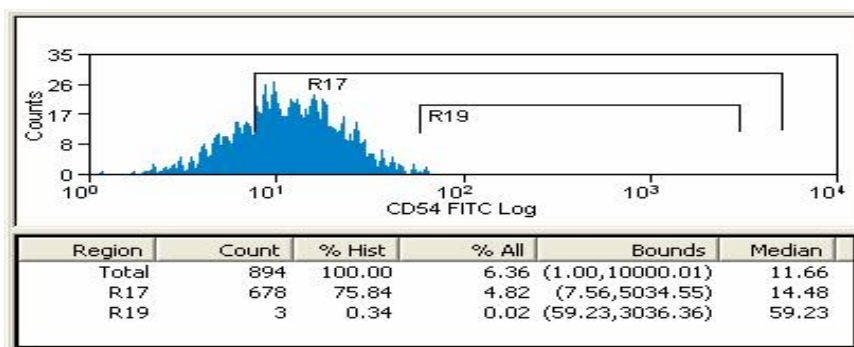
Obr. 6: Diagram profilu exprese CD19-PE versus CD5-APC, kontrola 24 hodin

Dále jsme zvlá- analyzovali populaci CD19 B bun k z bloku R6. Tyto bu ky jsme analyzovali v diagramu, který ur uje MFI aktiva ní molekuly CD54 (MFI = 27.74) (Obr. 7).



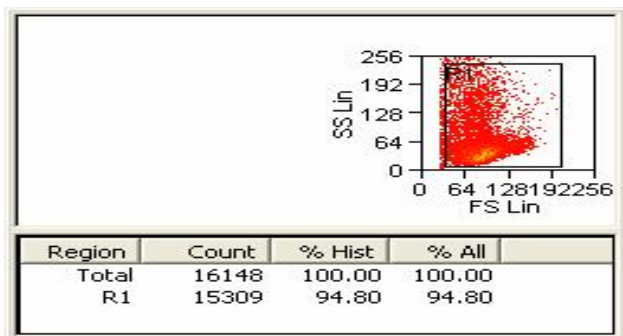
Obr. 7: Diagram po tu CD19 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, kontrola 24 hodin

Stejně jsme postupovali u populace CD5 B bun k z bloku R7. Bu ky jsme také analyzovali v diagramu, který ur uje MFI aktiva ní molekuly CD54 (MFI = 11.66) (Obr. 8).

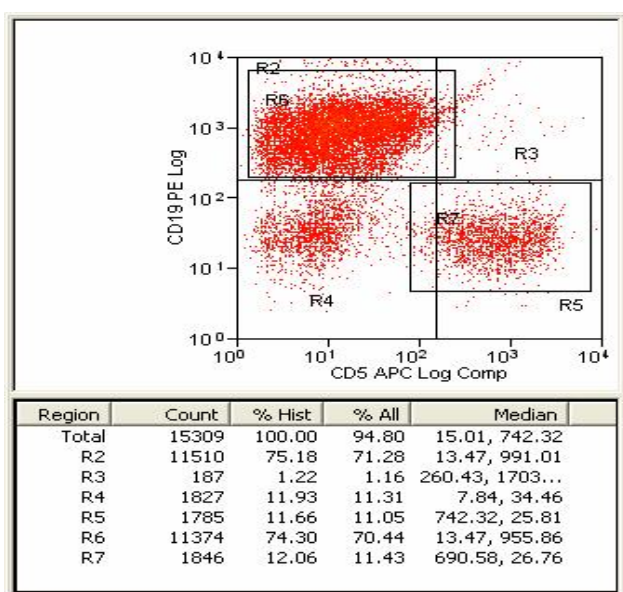


Obr. 8: Diagram po tu CD5 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, kontrola 24 hodin

Stejný postup jsme aplikovali pro analýzu infikovaných bun k. Dále jsou uvedeny originální diagramy analýzy molekuly CD54 exprimované na peritoneálních CD19 a CD5 B bu kách po 24, 48 a 72 hodinách infekce.

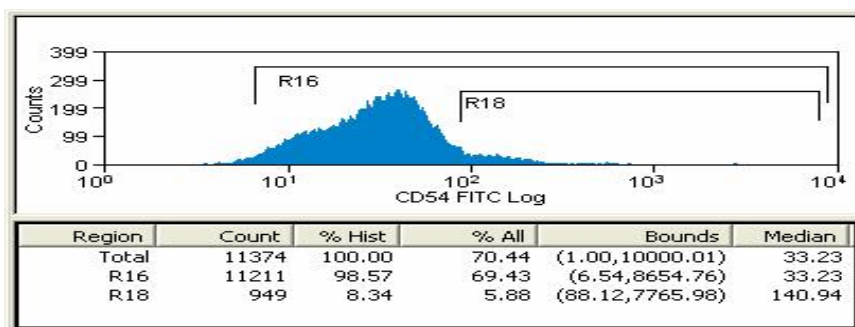


Obr 9: Diagram závislosti SS versus FS, infekce 24 hodin

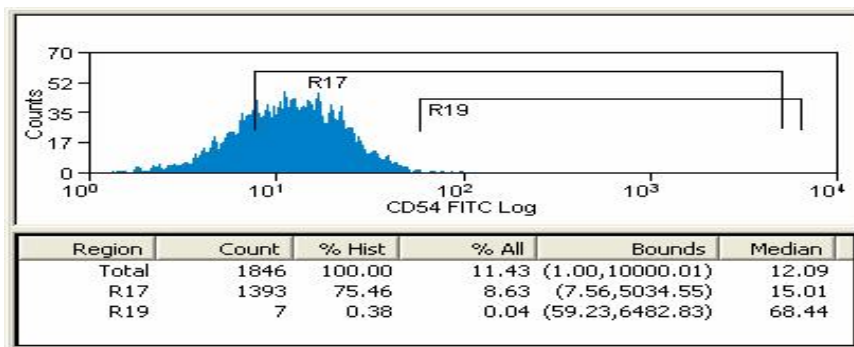


Obr. 10: Diagram profilu exprese CD19-PE versus CD5-APC, infekce 24 hodin

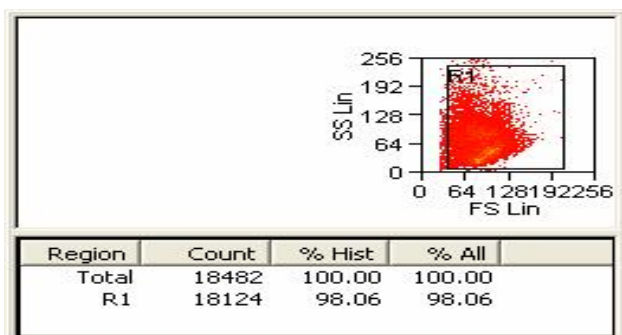
Hodnota MFI CD54 molekuly na CD19 B bu kách 24 hodin po infekci je 33.23 (Obr. 11), MFI pro CD54 molekulu na CD5 B bu kách má hodnotu 12.09 (Obr. 12).



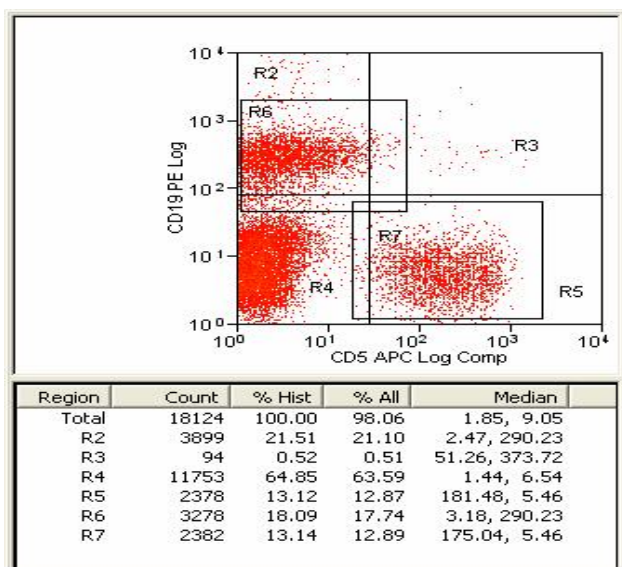
Obr. 11: Diagram po tu CD19 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 24 hodin



Obr. 12: Diagram po tu CD5 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 24 hodin

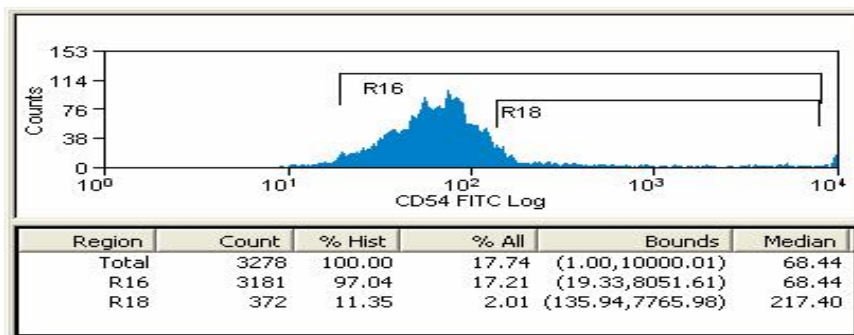


Obr. 13: Diagram závislosti SS versus FS, infekce 48 hodin

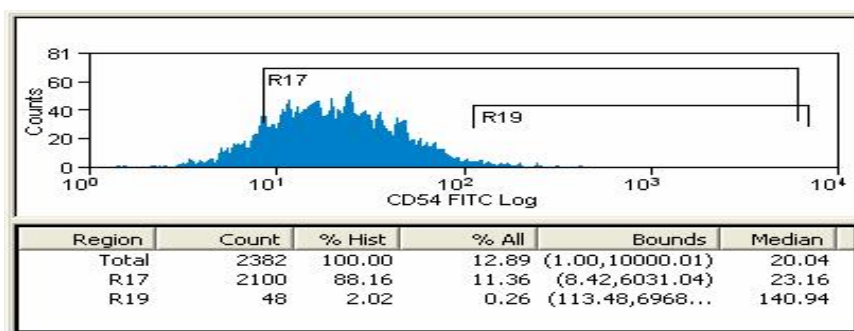


Obr. 14: Diagram profilu exprese CD19-PE versus CD5-APC, infekce 48 hodin

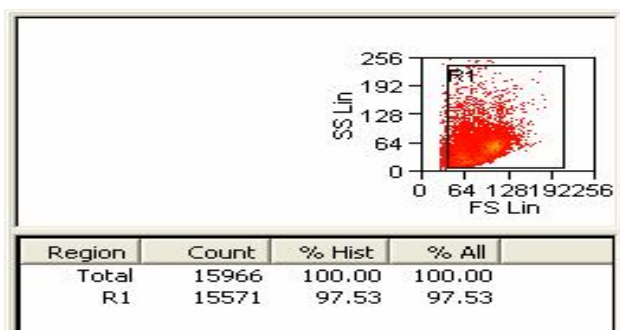
Hodnota MFI CD54 molekuly na CD19 B bu kách 48 hodin po infekci je 68.44 (Obr. 15), MFI pro CD54 molekulu na CD5 B bu kách má hodnotu 20.04 (Obr. 16).



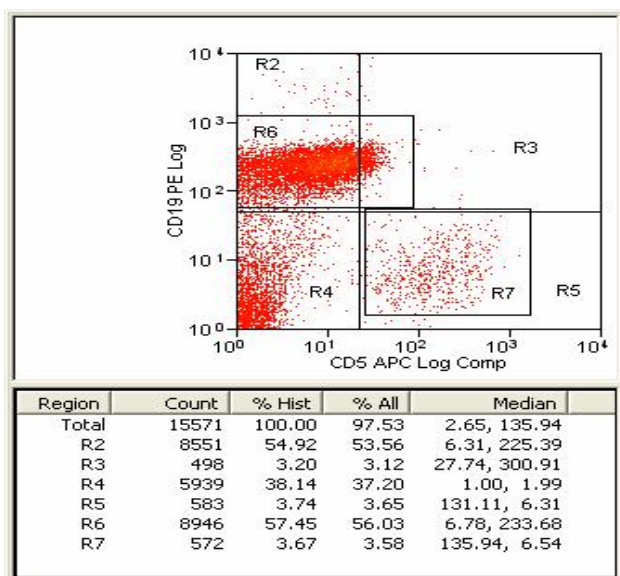
Obr. 15: Diagram po tu CD19 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 48 hodin



Obr. 16: Diagram po tu CD5 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 48 hodin

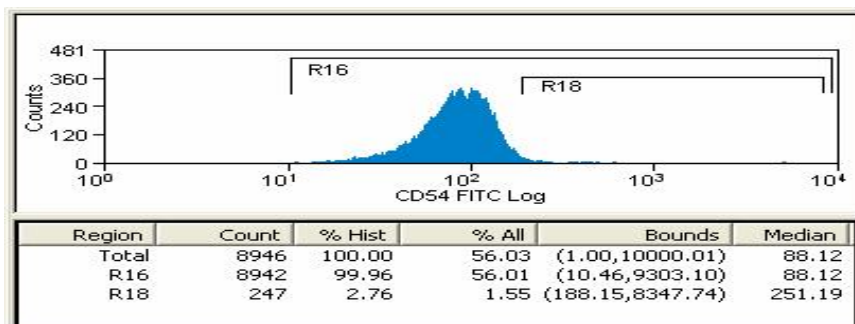


Obr. 17: Diagram závislosti SS versus FS, infekce 72 hodin

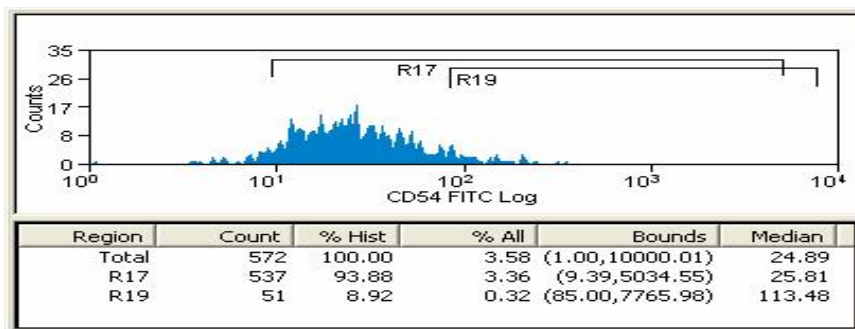


Obr. 18: Diagram profilu exprese CD19-PE versus CD5-APC, infekce 72 hodin

Hodnota MFI CD54 molekuly na CD19 B bu kách 72 hodin po infekci je 88.12 (Obr. 19), MFI pro CD54 molekulu na CD5 B bu kách má hodnotu 24.89 (Obr. 20).



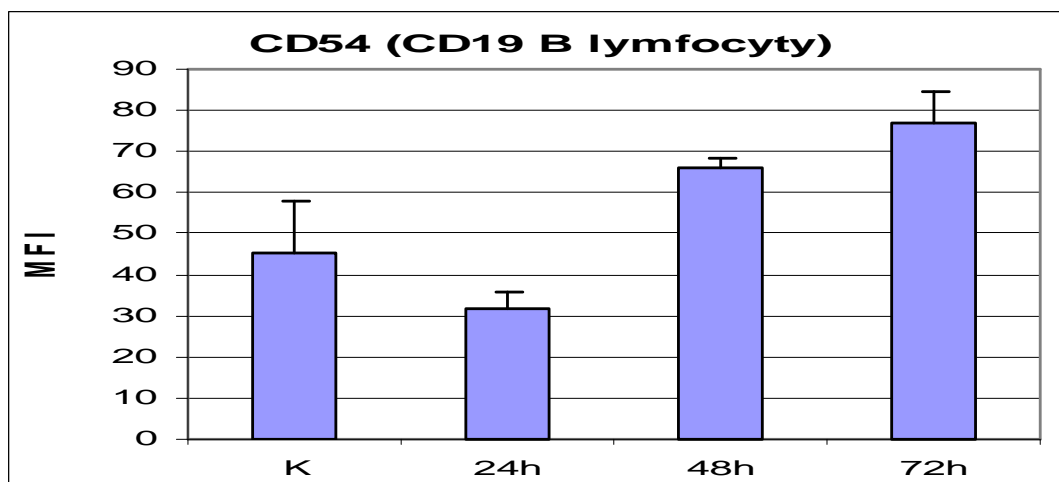
Obr. 19: Diagram po tu CD19 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 72 hodin



Obr. 20: Diagram po tu CD5 B bun k exprimujících molekulu CD54 v závislosti na MFI, infekce 48 hodin

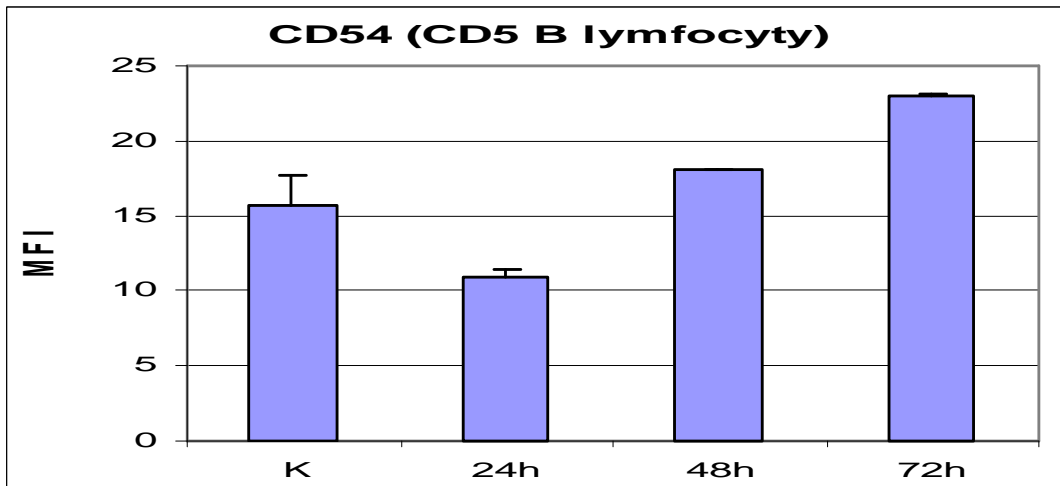
Jak již bylo uvedeno, získaná data jsme dále zhodnotili v grafech v programu Microsoft Excel. Z naměřených hodnot MFI kontrol po 24, 48 a 72 hodinách jsme udělali průměr a tuto hodnotu jsme vztahovali k hodnotám MFI získaných měřením peritoneálních CD19 a CD5 B buněk exprimujících aktivní molekulu CD54 po 24, 48 a 72 hodinách infekce.

Následuje vyhodnocení změny exprese povrchových molekul na peritoneálních CD19 a CD5 B buňkách po *in vivo* infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin.



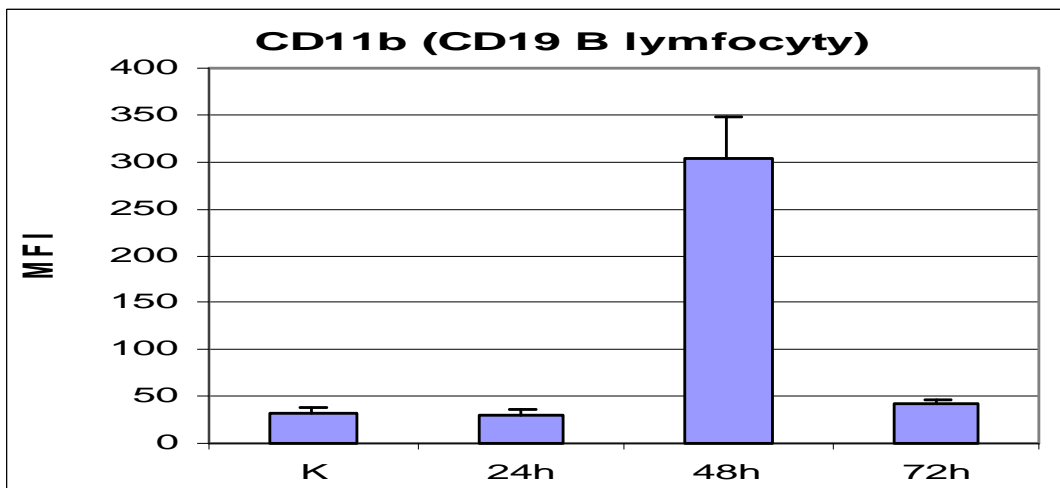
Graf 1: Změny v expresi molekuly CD54 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

K poklesu peritoneálních CD54 molekul exprimovaných na peritoneálních CD19 B buňkách došlo, v porovnání s buňkami kontrolními, po 24 hodinách infekce. Po 48 a 72 hodinách infekce došlo k nárůstu, přičemž po 72 hodinách byl nárůst signifikantní.



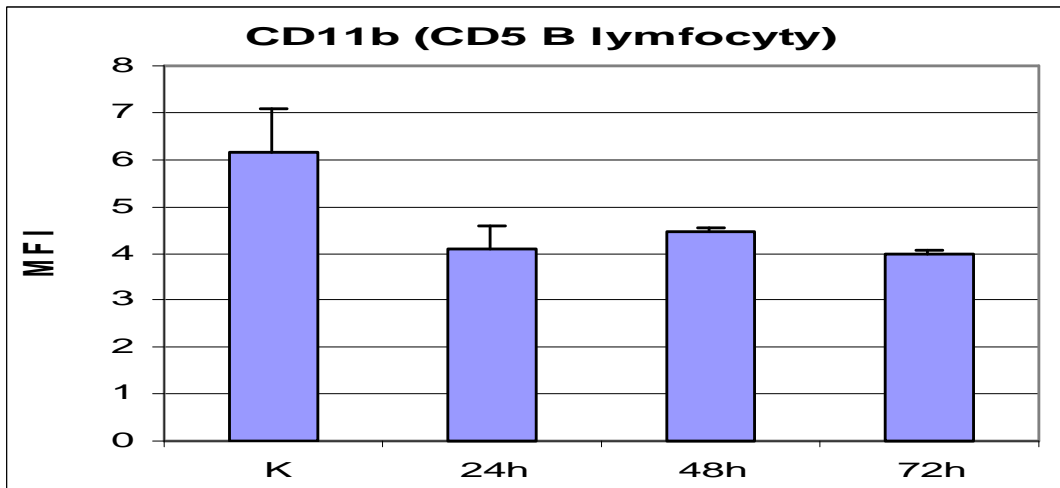
Graf 2: Změny v expresi molekuly CD54 na CD5 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Ke stejné situaci, jako na CD19 B bučkách, došlo na CD5 B bučkách. Po 24 hodinách infekce jsme zaznamenali pokles počtu CD54 molekul oproti kontrolním bučkám. Po 48 a 72 hodinách infekce došlo k nárůstu, po 72 hodinách byl nárůst téměř signifikantní.



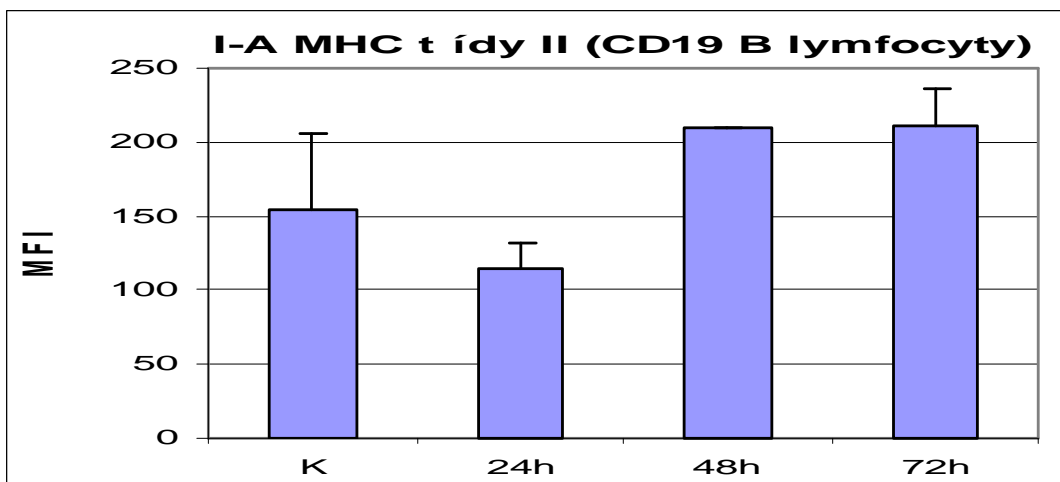
Graf 3: Změny v expresi molekuly CD11b na CD19 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

K signifikantnímu nárůstu exprese CD11b molekul na CD19 B bučkách došlo po 48 hodinách infekce. K nepatrnému poklesu v i kontrolním bučkám došlo po 24 hodinách infekce, ke slabému nárůstu po 72 hodinách infekce.



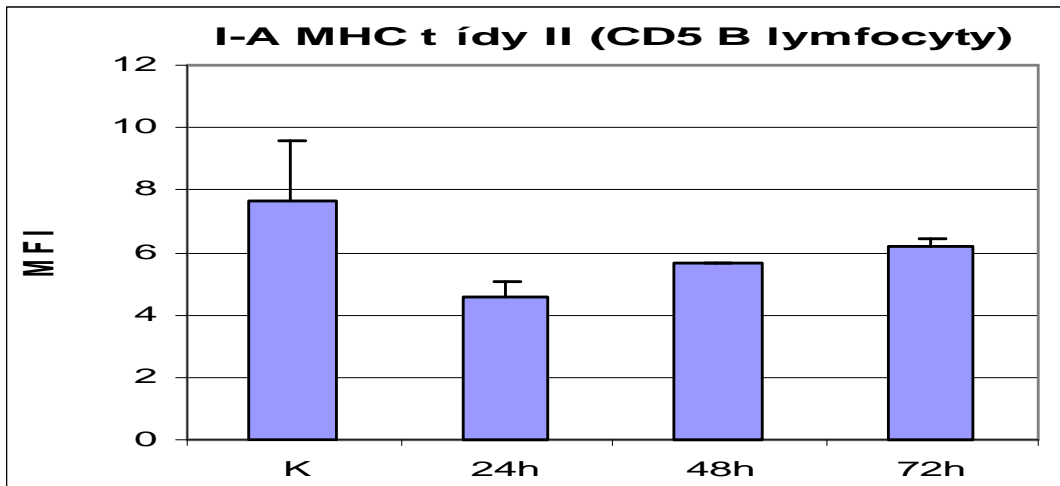
Graf 4: Změny v expresi molekuly CD11b na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

K signifikantnímu poklesu v expresi CD11b molekul na CD5 B buňkách došlo po 24 a 72 hodinách infekce. K poklesu došlo také po 48 hodinách infekce.



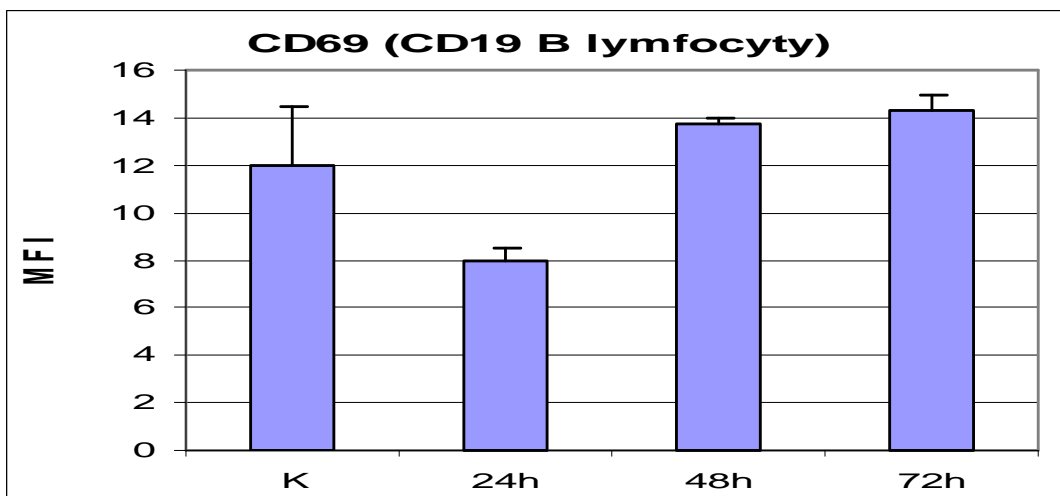
Graf 5: Změny v expresi molekuly I-A třídy II na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Nejprve, po 24 hodinách infekce, došlo k poklesu početnosti exprimovaných I-A molekul třídy II na CD19 B buňkách oproti buňkám kontrolním. Pak, po 48 a 72 hodinách infekce, jsme pozorovali nárůst v expresi těchto molekul.



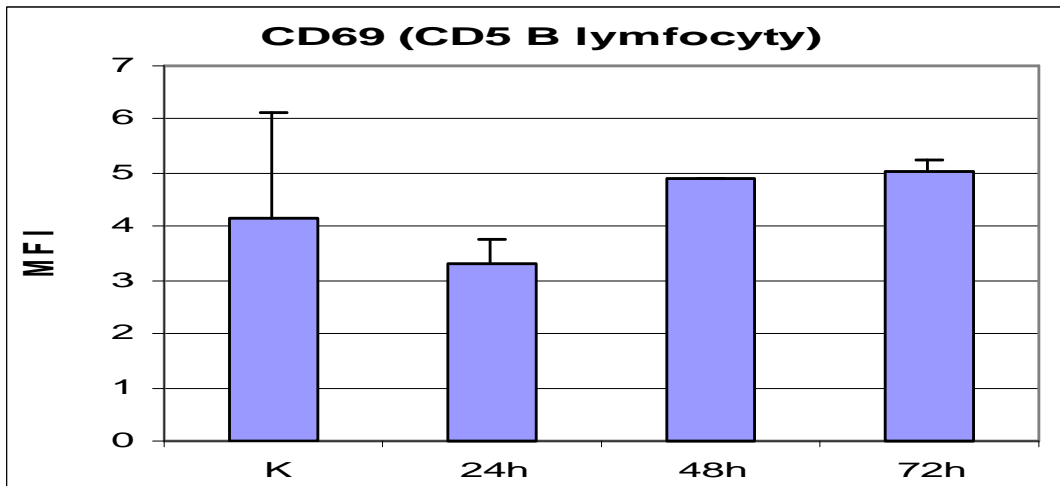
Graf 6: Změny v expresi molekuly I-A třídy II na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

Ve všech časových intervalech infekce došlo k poklesu exprese molekul I-A třídy II na CD5 B buňkách v srovnání s buňkami kontrolními.



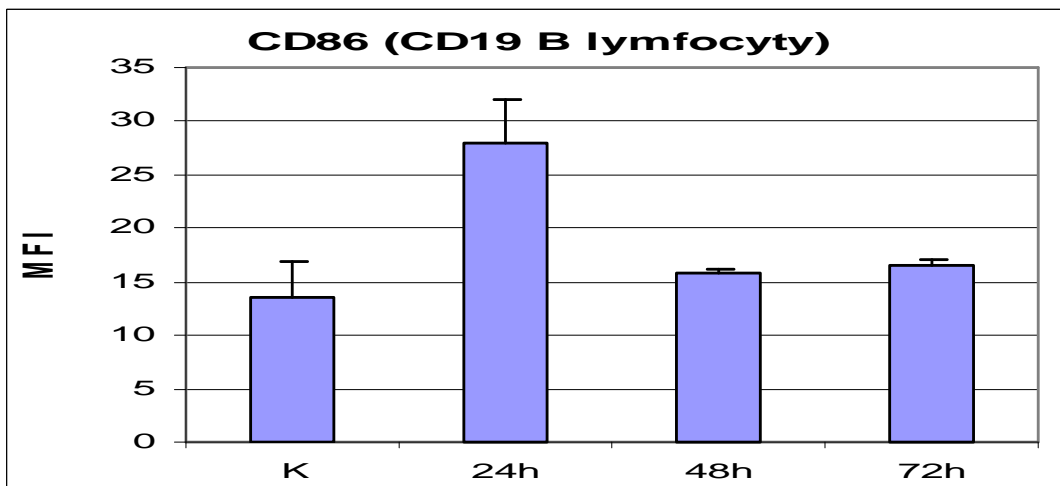
Graf 7: Změny v expresi molekuly CD69 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

Po 24 hodinách infekce došlo na CD19 B buňkách k poklesu exprese molekul CD69 v srovnání s buňkami kontrolními. Nárůstu jsme zaznamenali po 48 i 72 hodinách.



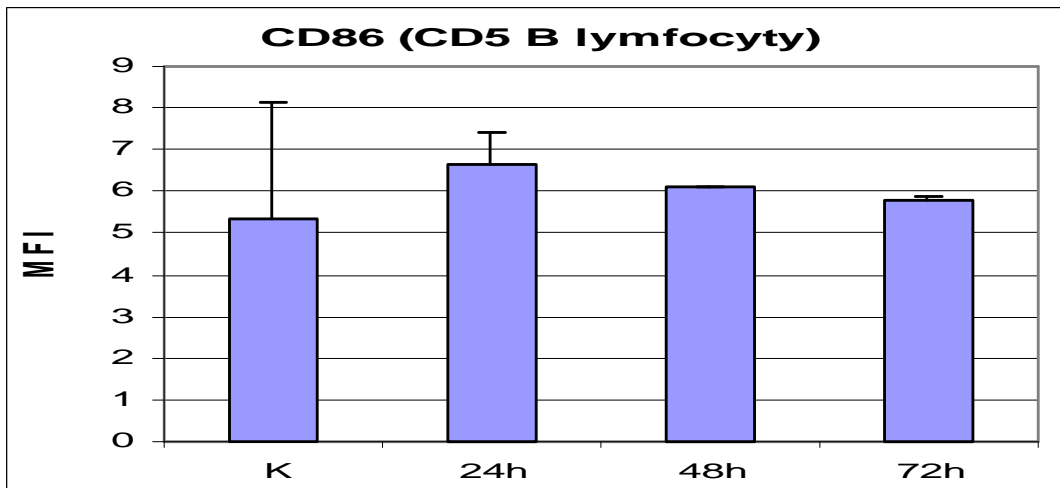
Graf 8: Změny v expresi molekuly CD69 na CD5 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Stejná situace, jako na CD19 B bučkách, nastala i na CD5 B bučkách. I zde došlo po 24 hodinách infekce k poklesu početnosti exprimovaných CD69 molekul, nárůst nastal 48 a 72 hodin po infekci.



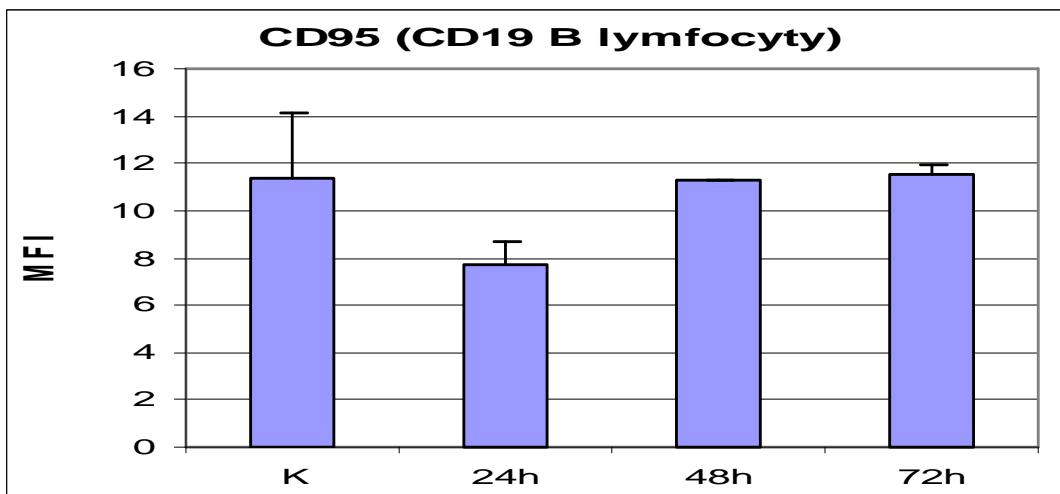
Graf 9: Změny v expresi molekuly CD86 na CD19 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

K signifikantnímu nárůstu početnosti CD86 molekul exprimovaných na CD19 B bučkách došlo 24 hodin po infekci. Nárůst byl patrný také 48 a 72 hodin po infekci.



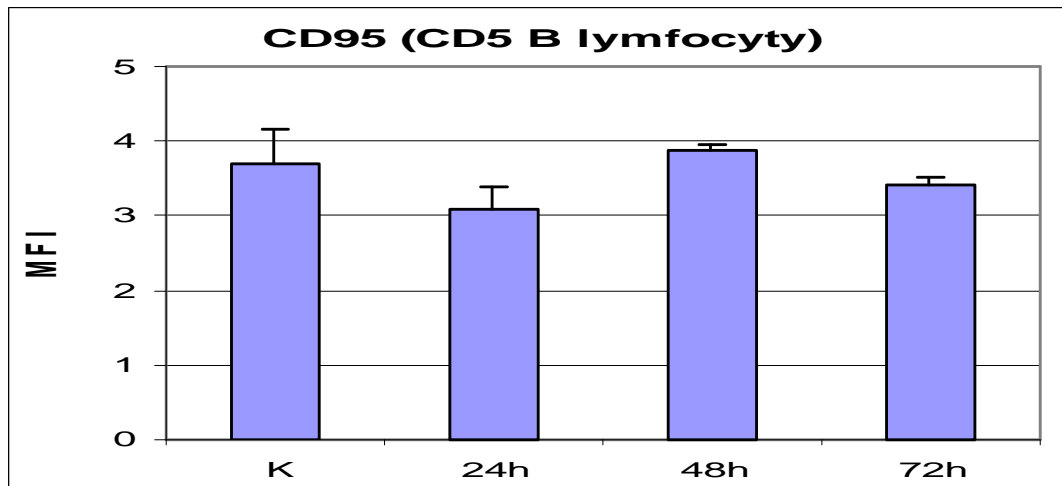
Graf 10: Změny v expresi molekuly CD86 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Ve všech časových intervalech infekce jsem zaznamenali nárůst exprese molekuly CD86 na CD5 B buňkách. Nárůst byl nejvyšší po 24 hodinách infekce.



Graf 11: Změny v expresi molekuly CD95 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Pokles exprese CD95 molekul na CD19 B buňkách nastal 24 a 48 hodin po infekci. Po 72 hodinách infekce se exprese CD95 molekul lehce zvýšila.



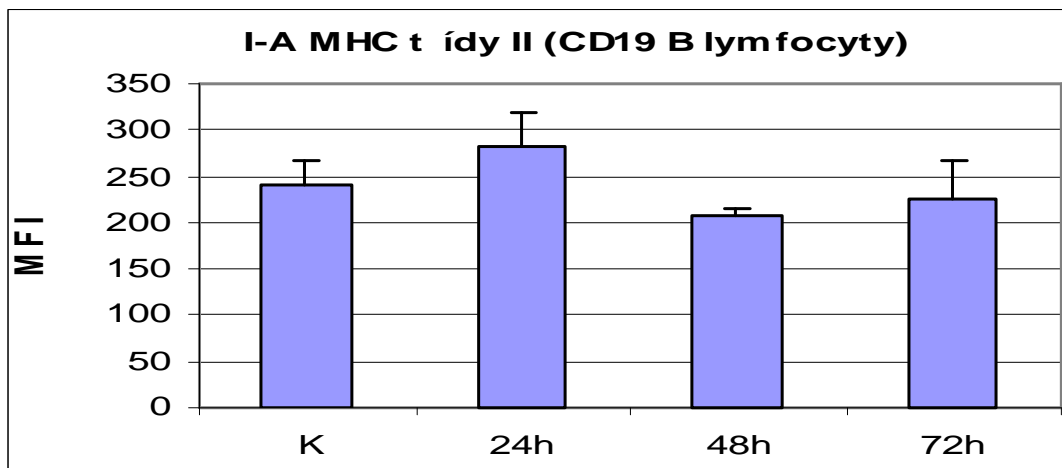
Graf 12: Změny v expresi molekuly CD95 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

K poklesu v expresi CD95 molekul na CD5 B buňkách došlo 24 a 72 hodin po infekci. Nárůst těchto molekul nastal po 48 hodinách infekce.

4.2 Změny v povrchových molekulách sleziných B buněk po *in vivo* infekci *F. tularensis* FSC200, 24, 48 a 72 hodin

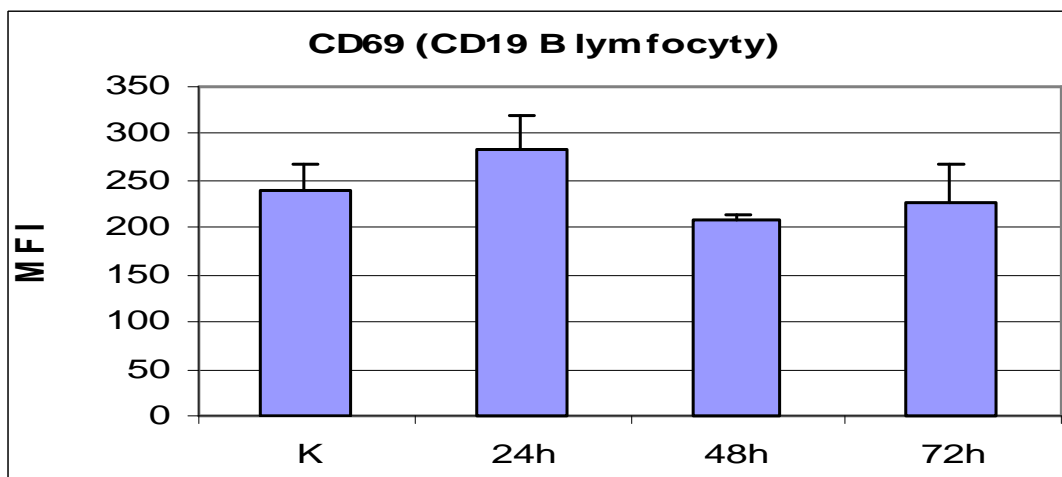
Z myši Balb/c, infikovaných *in vivo* *F. tularensis* FSC200, jsme vypreparovali sleziny. Ty jsme zpracovali na buněnou suspenzi o koncentraci 5×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Buňky jsme označili monoklonálními protilátkami konjugovanými s flouorofory. Pak jsme provedli analýzu pomocí průtokového cytometru. Výsledky z průtokového cytometru jsme vyhodnotili v programu Microsoft PowerPoint. Získaná data jsme nakonec zhodnotili v grafech v programu Microsoft Excel.

Změny v expresi povrchových molekul jsme hodnotili na základě hodnot MFI (median fluorescence intensity) pouze u buněk CD19+, vzhledem k velmi nízkému zastoupení CD5+ B buněk ve slezinách myši. Srovnávali jsme hodnoty infikovaných buněk po 24, 48 a 72 hodinách s hodnotami kontrolních buněk. Signifikanci nárůstu i poklesu exprese povrchových molekul jsme hodnotili T-testem.



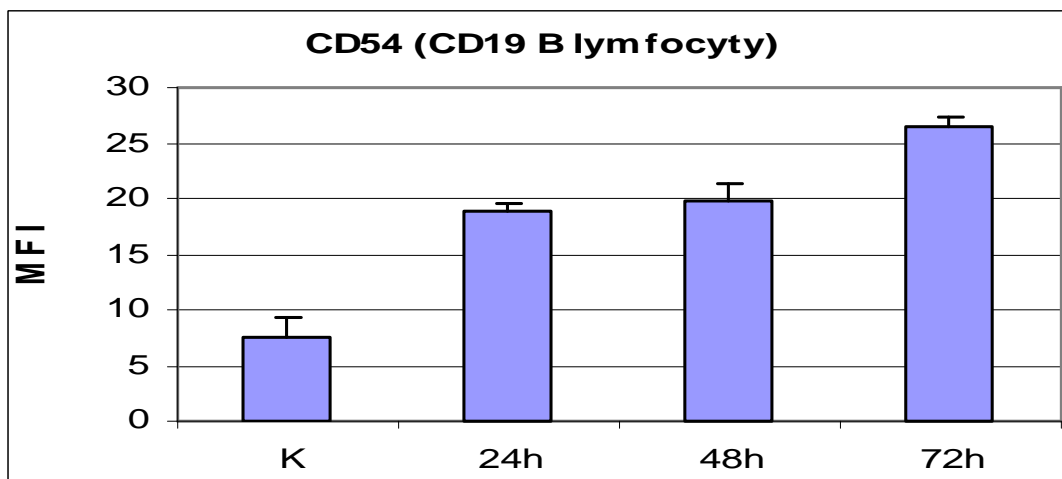
Graf 13: Změny v expresi molekuly I-A MHC třídy II na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

Na slezinných B buňkách došlo k nárůstu po dobu exprimovaných molekul I-A MHC třídy II, v srovnání s kontrolními buňkami, po 24 hodinové infekci. Po 48 a 72 hodinách infekce došlo k poklesu.



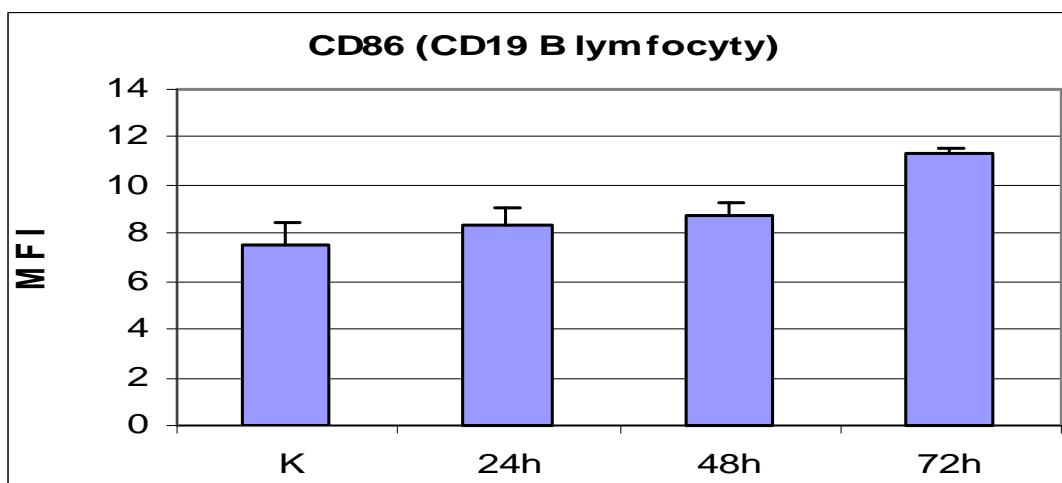
Graf 14: Změny v expresi molekuly CD69 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

K signifikantnímu poklesu po dobu CD69 molekul exprimovaných na slezinných B buňkách došlo po 72 hodinách infekce. Po 24 hodinách infekce došlo k nárůstu exprese CD69 molekul v srovnání s kontrolními buňkami, po 48 hodinách nastal pokles.



Graf 15: Změny v expresi molekuly CD54 na CD19 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrolě

Ve všech časových intervalech došlo k nárůstu exprese molekul CD54 na slezinných bučkách v i bučkám kontrolním. Po 72 hodinách infekce byl tento nárůst signifikantní.



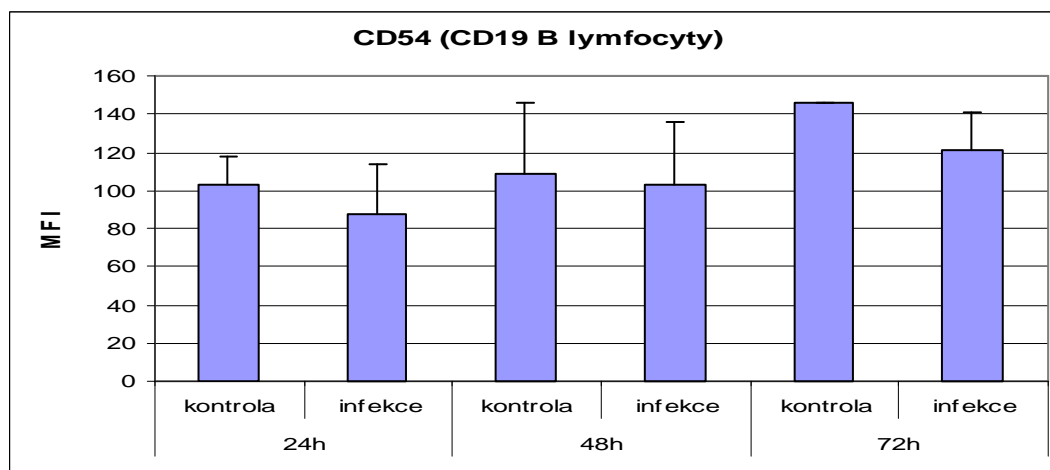
Graf 16: Změny v expresi molekuly CD86 na CD19 B bučkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrolě

V expresi CD86 molekul na slezinných B bučkách došlo také k nárůstu ve všech časových intervalech infekce. Po 72 hodinách infekce byl nárůst, v i kontrolním bučkám, signifikantní.

4.3 Změny v povrchových molekulách peritoneálních B buněk po *ex vivo* infekci *F. tularensis* FSC200, 24, 48 a 72 hodin

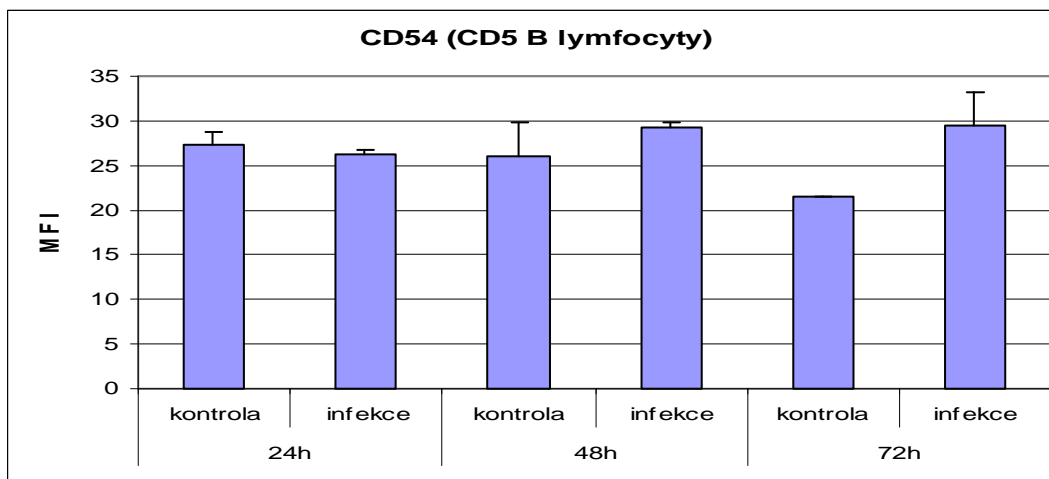
Peritoneální buňky, po infekci *F. tularensis* FSC200 *ex vivo*, jsme zpracovali na buněnou suspenzi o koncentraci 2×10^6 lymfocytů v 1 ml Cell Wash. Buňky jsme označili monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorescencí. Pak jsme provedli analýzu pomocí průtokového cytometru. Výsledky z průtokového cytometru jsme vyhodnotili v programu Microsoft PowerPoint. Získaná data jsme nakonec zhodnotili v grafech v programu Microsoft Excel.

Změny v expresi povrchových molekul jsme hodnotili na základě hodnot MFI (median fluorescence intensity). Srovnávali jsme hodnoty infikovaných buněk po 24, 48 a 72 hodinách s hodnotami kontrolních buněk. Signifikanci nárůstu i poklesu exprese povrchových molekul jsme hodnotili T-testem.



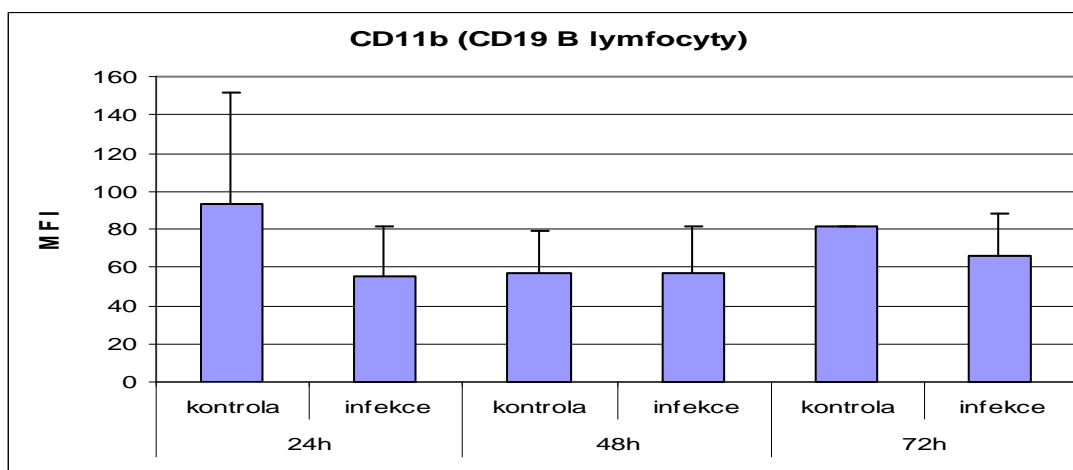
Graf 17: Změny v expresi molekuly CD54 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v srovnání s kontrolou

Ve všech časových intervalech po infekci došlo k poklesu podílu exprimovaných CD54 molekul na CD19 B buňkách oproti kontrolním buňkám.



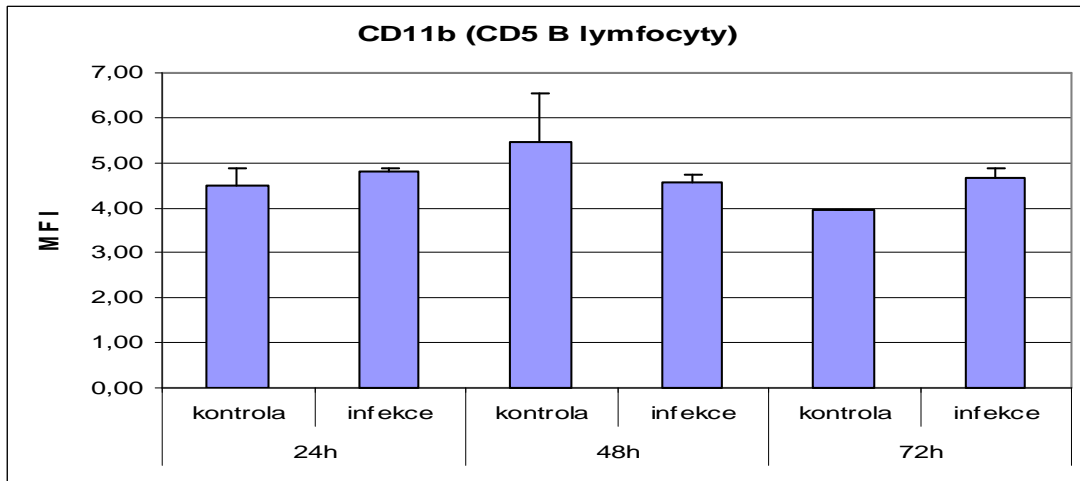
Graf 18: Změny v expresi molekuly CD54 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Po 24 hodinách infekce došlo k poklesu v expresi CD54 molekul na CD5 B buňkách v i buňkách kontrolním. Po 48 a 72 hodinách jsme zaznamenali nárůst těchto molekul.



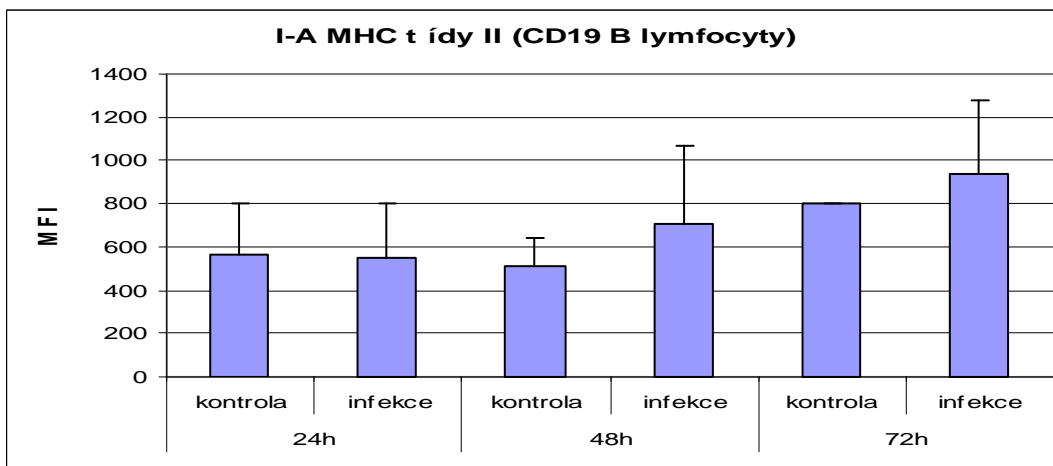
Graf 19: Změny v expresi molekuly CD11b na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

U CD11b molekul, exprimovaných na CD19 B buňkách, došlo po 24 hodinách infekce ke snížení počtu v i kontrolním buňkách. Po 48 hodinách infekce bylo množství exprimovaných CD11b molekul téměř stejné jako na kontrolních buňkách. Po 72 hodinách infekce došlo opět k poklesu.



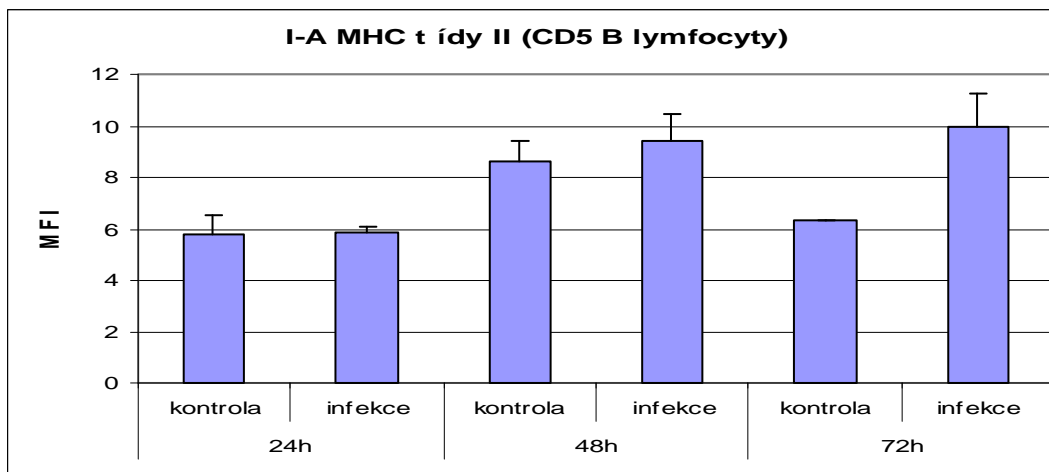
Graf 20: Změny v expresi molekuly CD11b na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

24 a 72 hodin po infekci jsme zjistili nárůst v expresi CD11b buněk na CD5 B buňkách ve srovnání s buňkami kontrolními. Pokles nastal 48 hodin po infekci.



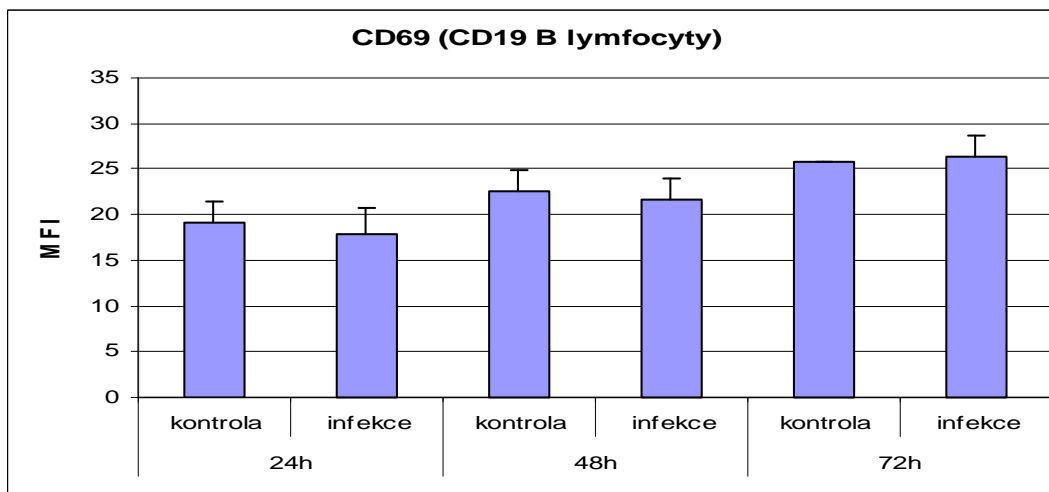
Graf 21: Změny v expresi molekuly I-A třídy II na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

V expresi molekul I-A třídy II byl po 24 hodinách infekce jen nepatrný pokles oproti kontrolním buňkám. Po 48 a 72 hodinách infekce došlo k nárůstu těchto molekul.



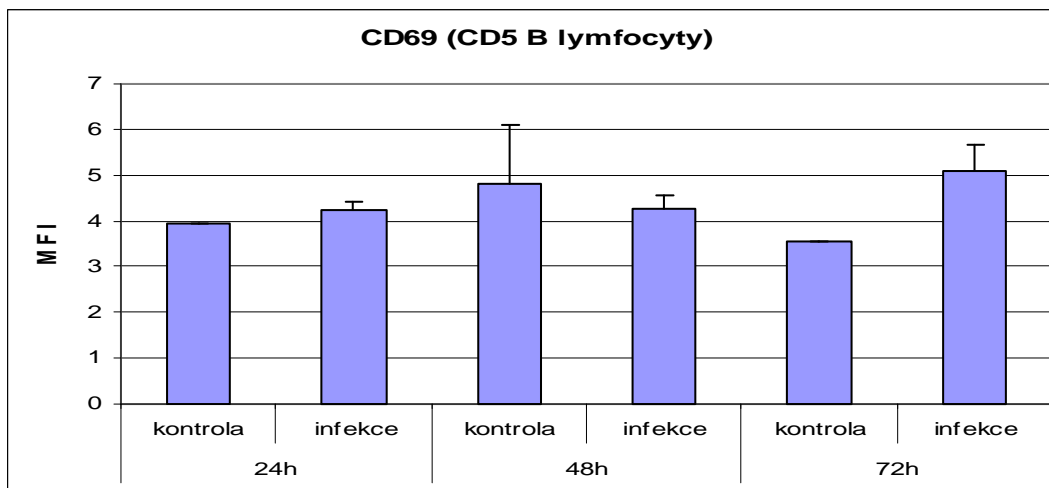
Graf 22: Změny v expresi molekuly I-A třídy II na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v kontrole

Na CD5 B buňkách jsme registrovali nárůst po tu exprimovaných I-A molekul třídy II ve všech časových intervalech po infekci. Avšak po 24 hodinách byl nárůst nepatrný.



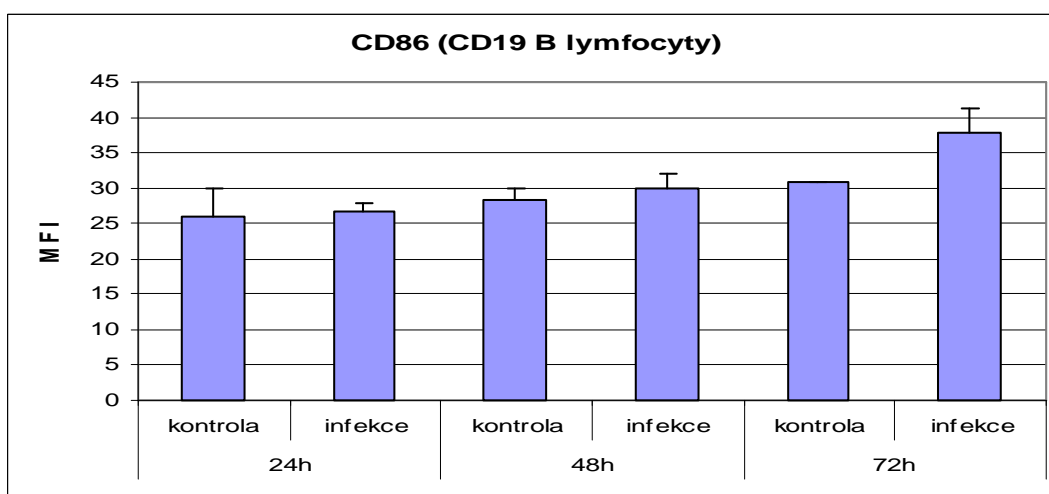
Graf 23: Změny v expresi molekuly CD69 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v kontrole

Pokles po tu exprimovaných CD69 molekul na CD19 B buňkách nastal 24 a 48 hodin po infekci. K nepatrnému nárůstu ve srovnání s kontrolními buňkami došlo 72 hodin po infekci.



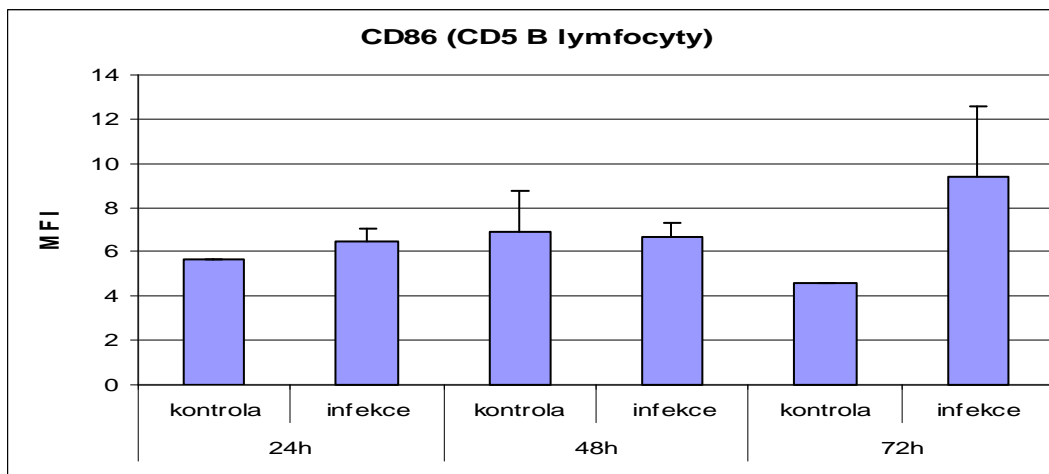
Graf 24: Změny v expresi molekuly CD69 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Nárůst exprese CD69 molekul na CD5 B buňkách nastal, v i buňkách kontrolním, 24 a 72 hodin po infekci. Po 48 hodinách infekce došlo k poklesu.



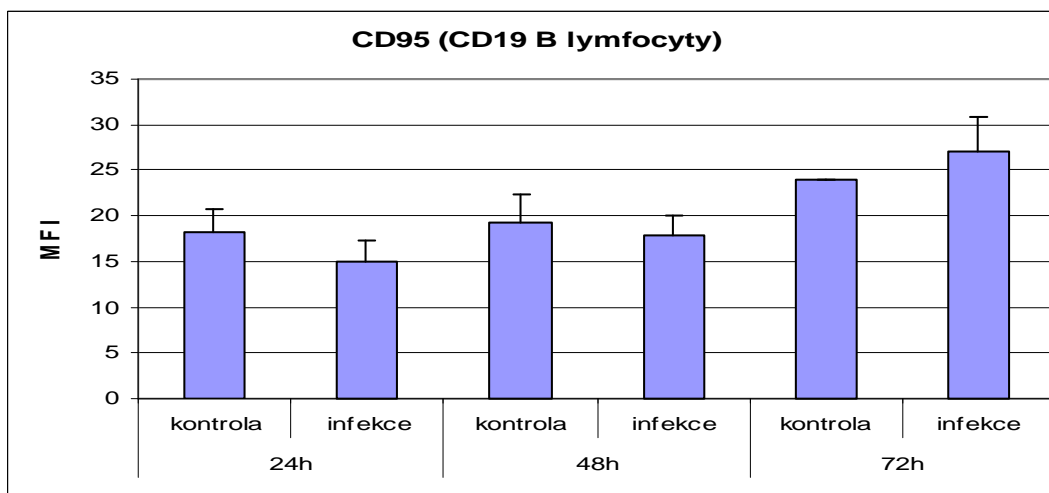
Graf 25: Změny v expresi molekuly CD86 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Ve všech časových intervalech po infekci došlo k nárůstu podílu CD86 molekul exprimovaných na CD19 B buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami.



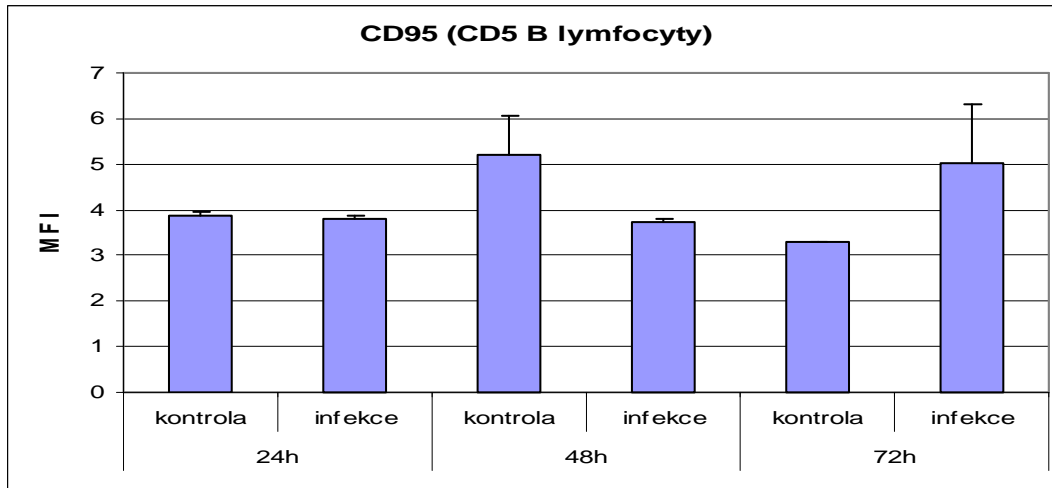
Graf 26: Změny v expresi molekuly CD86 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

24 a 72 hodin po infekci došlo k nárůstu v expresi CD86 molekul na CD5 B buňkách. Oproti kontrolním buňkám došlo 48 hodin po infekci k mírnému poklesu.



Graf 27: Změny v expresi molekuly CD95 na CD19 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Po 24 a 48 hodinách infekce došlo na CD19 B buňkách k poklesu exprese CD95 molekul oproti kontrolním buňkám. Po 72 hodinách infekce nastal nárůst těchto molekul.



Graf 28: Změny v expresi molekuly CD95 na CD5 B buňkách po infekci *F. tularensis* FSC200 za 24, 48 a 72 hodin v i kontrole

Také na CD5 B buňkách nastala stejná situace v expresi CD95 molekuly, jako na buňkách CD19. Pokles jsme registrovali 24 a 48 hodin po infekci, nárůst nastal po 72 hodinách infekce.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit změny v expresi aktivních molekul B buněk po infekci *F. tularensis*. Tyto změny jsme zkoumali na B buňkách Balb/c myši, které jsou geneticky citlivé k *F. tularensis*. Zaměřili jsme se na slezinné CD19 B buňky a peritoneální CD19 a CD5 B buňky po infekci *F. tularensis* FSC200 v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin. Změny v expresi povrchových markerů slezinných B buněk jsme zkoumali po *in vivo* infekci. Peritoneální B buňky jsme hodnotili jak po *in vivo* infekci, tak po infekci *ex vivo*. Analyzovali jsme expresi těchto aktivních markerů: CD54, CD69, CD86, CD95, MHC II a CD11b/CD18. Všechna měření jsme provedli metodou průtokové cytometrie.

Molekula CD54, označovaná také jako ICAM-1, patří do imunoglobulinové superrodiny adhezivních molekul. Exprese této molekuly se na endoteliálních buňkách zvyšuje při odpovědi na zánětlivé cytokiny jako je TNF- α , IL-1 a IFN- γ . Při akutních a chronických zánětlivých onemocněních se endoteliální buňky aktivují a exprimují vysoké hladiny ICAM-1. S touto adhezivní molekulou interagují receptory leukocytů, což je klíčové pro adhezi leukocytů a transendoteliální migraci. Na slezinných CD19 B buňkách docházelo během infekce *F. tularensis* FSC200 k postupnému zvýšení exprese molekul CD54. Maximální nárůst nastal tedy po 72 hodinách infekce. Jinak tomu bylo u peritoneálních CD19 B buněk jak po *in vivo*, tak po *ex vivo* infekci. Po *in vivo* infekci nastal sice také maximální nárůst po tu exprimovaných CD54 molekul po 72 hodinách infekce, předcházel mu však po 24 hodinách infekce pokles. Jiná situace nastala u CD19 B buněk po infekci *ex vivo*. Tady jsme ve všech časových intervalech infekce zaznamenali pokles exprese těchto molekul oproti buňkám kontrolním. K aktivaci molekuly CD54 na CD19 B buňkách je zřejmě zapotřebí přítomnost buněčných populací či mediátorů, které fungují pouze v *in vivo* systému.

Na peritoneálních CD5 B buňkách jsme po *in vivo* infekci zaznamenali obdobný trend jako u peritoneálních CD19 B buněk, rovněž po *in vivo* infekci. Po 24 hodinách infekce vystřídal nárůst exprese CD54 molekul s maximem

po 72 hodinách infekce. Stejně tomu bylo i v expresi CD54 molekul na CD5 peritoneálních B buňkách po *ex vivo* infekci.

Selvaraj a kol.⁴⁷ odhalili, že *E. coli* K1 je schopna selektivně zvyšovat regulaci exprese ICAM-1 molekuly při invazi této bakterie do lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk mozku (HBMEC). Rozhodující pro tuto zvýšenou regulaci exprese ICAM-1 na HBMEC buňkách byla interakce vnějšího membránového proteinu A (OmpA) *E. coli* s jeho receptorem, Ecgp, na HBMEC buňkách. To tedy ukazuje, že zvýšená regulace ICAM-1 nebyla způsobena cytokiny sekretovanými HBMEC buňkami při infekci bakterií. Nabízí se tedy vysvětlení, že i *F. tularensis* může selektivně indukovat expresi ICAM-1 na B buňkách prostřednictvím specifických povrchových struktur a sekrecí určitých mediátorů.

Molekula CD69 se nachází na leukocytech. Jde o nejčasněji aktivovanou buněčnou povrchovou receptor. Je konstitutivně exprimovaný krevními destičkami, zralými thymocyty a dále myeloidními a lymfoidními prekurzory kostní dřeně. Neobjevuje se na lymfocytech periferní krve, ale je exprimovaný subpopulacemi T a B buněk v periferních lymfatických tkáních. Exprese molekuly CD69 na leukocytech je indukována cytokiny.

Exprese této molekuly na slezinných CD19 B buňkách se zvýšila za 24 hodin po infekci. Na rozdíl od slezinných buněk, CD19 a CD5 B buňky v peritoneu vykazovaly spíše snížení časněho aktivního markeru. Obdobně reagovaly obě populace B buněk v systému *ex vivo*. Pouze u CD5 peritoneálních B buněk došlo k aktivaci 72 hodin po infekci *F. tularensis* FSC200 *ex vivo*.

Zkoumáním role HSP60 při aktivaci B buněk, objevili Cohen-Sfady a kol.¹⁹, že lidský HSP60 schopen aktivovat B buňky. Stimulací naivních B buněk myší tímto proteinem došlo k proliferaci B buněk a k sekreci IL-6 a IL-10. Došlo také ke zvýšené regulaci exprese MHC třídy II a dalších molekul jako například CD69, CD40 a B7-2. Také *F. tularensis* disponuje na svém povrchu molekulou HSP60, a je tedy možné, že HSP vede ke stimulaci B buněk a ke zvýšené expresi molekuly CD69. A to hlavně na CD19 slezinných B buňkách a CD5 peritoneálních B buňkách infikovaných *ex vivo*.

CD86, označovaná také jako B7-2, je molekula, která se vyskytuje na povrchu buněk prezentujících antigen jako jsou dendritické buňky, makrofágy a B buňky. Exprese CD86 je omezena především na krvetvorné buňky. Prokázání CD86, mimo jiné, zvýšeně reguluje proliferaci B buněk.

Ke zvýšené expresi CD86 molekul došlo na CD19 B buňkách slezin, na CD19 B buňkách peritonea po *in vivo* i *ex vivo* infekci a také na CD5 B buňkách peritonea infikovaných *in vivo*. Nejvýraznější exprese nastala u *in vivo* infikovaných peritoneálních CD19 i CD5 B buněk 24 hodin po infekci. Na slezinných CD19 a peritoneálních *ex vivo* infikovaných B buňkách po 72 hodinách infekce. Po *ex vivo* infekci CD5 B lymfocytů došlo ke zvýšené expresi 24 a 72 hodin po infekci.

Na modelu plicní infekce myši, způsobené *F. tularensis* LVS, zkoumali Bosio a Dow⁴⁸ interakci s alveolárními makrofágy a dendritickými buňkami dýchacích cest. Experimenty provedli jak *in vivo*, tak *in vitro*. Na rozdíl od makrofágů došlo brzy po infekci na dendritických buňkách ke zvýšené expresi MHC třídy II a CD86. Avšak nedošlo, u dendritických buněk, k navození tvorby několika klíčových prozánčlivých cytokinů, jako je TNF- α a IL-6. *F. tularensis* však vyvolala produkci ústředního imunosupresivního cytokinu TGF- β jak u dendritických buněk, tak u makrofágů. Zdá se, že produkce tohoto cytokinu antigen-prezentujícími buňkami v plicích má za následek zhoršenou kontrolu průběhu infekce. Pokud by byly totiž odstraněny plicní makrofágy a dendritické buňky, myši přežily déle. Zvýšená exprese CD68 molekul na všech typech námi zkoumaných B buněk po *in vivo* i *ex vivo* infekci *F. tularensis* může mít za následek stimulaci produkce některých cytokinů.

Zvýšená exprese CD86 molekuly může být také způsobována schopností HSP60 *F. tularensis* aktivovat B buňky, jak popsali Cohen-Sfady a kol.¹⁹ na naivních B buňkách myši po stimulaci lidským HSP60.

Podle Katze a kol.⁸ dokáže *F. tularensis* LVS stimulovat zvýšenou regulaci exprese, mimo jiné, CD86 molekuly na dendritických buňkách myši a to prostřednictvím TLR-2 receptoru. I toto může být jednou z příčin zvýšené exprese CD86 molekuly na slezinných i peritoneálních B buňkách myši po infekci *F. tularensis* FSC200.

CD95 (APO-1/Fas) je buněný povrchový smrtící receptor, který indukuje apoptózu. Kontroluje homeostázu mnoha tkání a má rozhodující roli v kontrole imunitní odpovědi a potlačení nádoru. Interakce s jeho ligandem, CD95L (CD178/FasL), hraje klíčovou úlohu v regulaci periferní tolerance a lymfoidní homeostázy.

Na slezinných B buňkách jsme zmapovali v expresi této molekuly časových obdobích. Ke zvýšené expresi CD95 molekul na CD19 B buňkách došlo až po 72 hodinách *in vivo* i *ex vivo* infekce. Stejný charakter exprese CD95 molekul nastal také u CD5 B buněk po *ex vivo* infekci. U *in vivo* infikovaných CD5 B buněk peritonea došlo ke zvýšené expresi CD95 buněk jen po 48 hodinách infekce.

Již dříve byla prokázána, díky studii Krošové a kol.¹⁷, apoptóza mění prouhy cytometrií (AnnexinV) u CD19 slezinných buněk. Vzhledem k tomu, že u peritoneálních B buněk jsme detekovali sníženou expresi CD95 molekuly v různých fázích infekce (24 a 48 hodin), dochází k aktivaci této molekuly bakterií *F. tularensis* zřejmě jednoduše ve slezinách myši Balb/c.

MHC proteiny třídy II jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách zahrnujících monocyty, makrofágy, dendritické buňky a B buňky. Nachází se také na thymových epiteliálních buňkách a gliových buňkách. Tato molekula hraje klíčovou roli ve vývoji specifických imunitních odpovědí proti patogenům.

Na slezinných CD19 B buňkách jsme pozorovali nárůst počtu molekul MHC třídy II pouze 24 hodin po infekci. U peritoneálních CD19 B buněk jak po *in vivo*, tak po *ex vivo* infekci, došlo ke zvýšené expresi MHC molekuly třídy II 48 a 72 hodin po infekci. Na CD5 B buňkách po *ex vivo* infekci jsme ve větších časových intervalech registrovali zvýšenou expresi dané molekuly. Na CD5 B buňkách, infikovaných *in vivo*, došlo ve větších časových intervalech k poklesu exprese molekuly MHC třídy II. Jednou z možných příčin zvýšené exprese MHC molekuly třídy II po infekci *F. tularensis* FSC200 může být stimulace B buněk prostřednictvím TLR-2 receptoru *F. tularensis*. Katze a kol.⁸ prokázali tuto skutečnost v průběhu infekci *F. tularensis* LVS na dendritických buňkách myši.

Ke zvýšené expresi této molekuly na B bučkách mohlo dojít také díky aktivaci prostřednictvím HSP60 *F. tularensis*. Cohen-Sfady a kol.¹⁹ prokázali tuto skutečnost aktivací naivních B buněk myší prostřednictvím lidského HSP60.

CD11b/CD18 (CR3, Mac-1) je hlavní α 2 integrin exprimovaný na neutrofilech. Zastává významné funkce v imunitě a zánětu. Tato adhezivní molekula hraje klíčovou roli při pevném připojení cirkulujících leukocytů, zejména neutrofilů, k cévnímu endotelu, stejně jako v transendoteliální migraci do tkání. Peritoneální B-1 bučky exprimují na svém povrchu CD11b v komplexu s molekulou CD18, který se nazývá Mac-1/CR3 komplementový receptor a adhezivní molekula.

Přítomnost této molekuly jsme měřili pouze na membránách peritoneálních B lymfocytů. K výrazné zvýšené expresi této molekuly došlo na peritoneálních CD19 B bučkách 48 hodin po *in vivo* infekci. Slabý nárůst jsme registrovali také 72 hodin po infekci. *Ex vivo* infikované CD19 B bučky vykazovaly snížení počtu exprimovaných CD11b molekul po 24 a 72 hodinách. Po 48 hodinách infekce bylo množství těchto molekul téměř stejné jako na bučkách kontrolních. Ke snížené expresi dané molekuly na CD5 B bučkách došlo ve všech časových intervalech *in vivo* infekce. Na CD5 B bučkách, po *ex vivo* infekci *F. tularensis* FSC200, došlo ke zvýšené expresi CD11b molekuly po 24 a 72 hodinách.

Nasr a kol.⁴⁹ prokázali, že adhezí zprostředkovaná fagocytóza *F. tularensis* LVS lidskými dendritickými buňkami je závislá na expresi komplementových receptorů, CR3 (CD11/CD18) a CR4 (CD11c/CD18) a na opsoninech odvozených od komplementového faktoru C3. Je tedy možné, že zvýšená exprese CD11b molekul na peritoneálních B bučkách hraje stejnou úlohu i u této buněčné populace při fagocytóze zprostředkované adhezí *F. tularensis* FSC200.

Jak je vidět z výsledků, *F. tularensis* je schopna aktivovat v těle studovaných molekul B buněk v různých fázích infekce. Rozdíly byly patrné ve vzájemném porovnání *in vivo* a *ex vivo* systémů a v porovnání jednotlivých B buněčných populací CD19 a CD5.

Ve většině případů docházelo k rozdílným expresím povrchových markerů B buněk populací při srovnání infekce *in vivo* a *ex vivo*. Z toho je zřejmé, že se do interakce B buněk s *F. tularensis*, při *in vivo* infekci, zapojují i jiné součásti imunitního systému. Pro další studia interakce slezinných i peritoneálních B buněk populací s *F. tularensis* je tedy vhodné pracovat v *in vivo* systému.

6. LITERATURA

1. Henry T., Monack D. M.: Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors. Cellular Microbiology, 2007.
2. McLendon M. K., Apicella M. A., Allen L-A H.: *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. Annu. Rev. Microbiol., 2006, 60: s 167-85.
3. Macela A. a kolektiv: Infek ní choroby a intracelulární parazitismus bakterií. Grada 2006, s 111-113.
4. Hajjar A. M., Harvey M. D., Shaffer S. A., Goodlett D. R., Sjöstedt A., Edebro H., Forsman M., Byström M., Pelletier M., Wilson Ch. B., Miller S. I., Skerrett S. J., and Ernst R. K.: Lack of In Vitro Recognition of *Francisella tularensis* Subspecies Lipopolysaccharide by Toll-Like Receptors. Infection and Immunity, 2006, 74: s 6730-6738.
5. Kieffer T. L., Cowley S., Nano F. E., Elkins K. L.: *Francisella novicida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novicida* murine pathogenesis. Microbes and Infection, 2003, s 397-403.
6. 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(6): s 2041-2046.

7. 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. *Immunol Lett.*, 2005, 97(1): s 151-154.
8. Katz J., Zhang P., Martin M., Vogel S. N., Michalek S. M.: Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Response to *Francisella tularensis* LVS. *Infection and Immunity*, 2006, 74(5): s 2809-2816.
9. Rajaram M. V. S., Ganesan L. P., Parsa K. V. L., Parsa K. V. L., Buchar J. P., Gunn J. S., Tridandapani S.: Akt/Protein Kinase B Modulates Macrophage Inflammatory Response to *Francisella* Infection and Confers a Survival Advantage in Mice. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: s 6317-6324.
10. Golovliov I., Baranov V., Krocova Z., Kovarova H., Sjöstedt A.: An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* Can Escape the Phagosome of Monocytic Cells. *Infection and Immunity*, 2003, 71(10): s 5940-5950.
11. Hrstka R., Krocová Z., Černý J., Vojtěšek B., Macela A., Stulík J.: *Francisella tularensis* Strain LVS Resides in MHC II-Positive Autophagic Vacuoles in Macrophages. *Folia Microbiol*, 2007, 52(6): s 631-636.
12. Novosad J., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Phenotype profile of effectively activated macrophage J774.2 cells. Zasláno k publikaci.
13. Dreisbach V. C., Cowley S., and 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(4): s 1988-1996.

14. 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: s 3277-3284.
15. Stenmark S., Lindgren H., Tärnvik A., Sjöstedt A.: Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35: s 73-80
16. Stenmark S., Sjöstedt A.: Transfer of specific antibodies results in increased expression of TNF- and IL12 and recruitment of neutrophils to the site of a cutaneous *Francisella tularensis* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53: s 501-504.
17. Krocova Z., Härtlova A., Souckova D., Zivna L., Kroca M., Rudolf E., Macela A., Stulik J.: Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(2): s 79-85.
18. Milner E. C. B., Anolik J., Cappione A., Sanz I.: Human innate B cells: a link between host defence and autoimmunity?. 2005
19. 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: s 3594-3602.
20. 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(4): s 1374-1380.

21. Perrin-Cocon L. A., Villiers Ch. L., Salamero J., Gabert F., Marche P. N.: B Cell Receptors and Complement Receptors Target the Antigen to Distinct Intracellular Compartments. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: s 3564-3572.
22. Menon A., Shroyer M. L., Wampler J. L., Chawan C. B., Bhunia A. K.: In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2003, 26: s 157-174.
23. Bhunia, Kumar A., Feng X.: Examination of Cytopathic Effect and Apoptosis in *Listeria monocytogenes*-Infected Hybridoma B-Lymphocyte (Ped-2E9) Line *In Vitro*. *Journal of Mikrobiology and Biotechnology*, 1999, 9(4): s 398-403.
24. Fehr T., Rickert R. C., Odermatt B., Roes J., Rajewsky K., Hengartner H., Zinkernagel R. M.: Antiviral Protection and Germinal Center Formation, But Impaired B Cell Memory in the Absence of CD19. *J. Exp. Med.*, 1998, 188(1): s 145-155.
25. Zhou J.-L., Smith H. M., Waldschmidt T. J., Schwarting R., Daley J., Tedder T. F.: Tissue-Specific Expression of the Human CD19 Gene in Transgenic Mice Inhibits Antigen-Independent B-Lymphocyte Development. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(6): s 3884-3894.
26. Sato S., Steeber D. A., Tedder T. F.: The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: s 11558-11562.

27. Kaplan D., Smith D., Meyerson H., Pecora N., Lewandowska K.: CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Baar virus transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): s 13850-13853.
28. Appleyard G. D., Wilkie B. N.: Characterization of porcine CD5 and CD5⁺ B cells. *Clin Exp Immunol*, 1998, 111: s 225-230.
29. Prez-Villar J. J., Whitney G. S., Bowen M. A., Hewgill D. H., Aruffo A. A., Kanner S. B.: CD5 Negatively Regulates the T-Cell Antigen Receptor Signal Transduction Pathway: Involvement of SH2-Containing Phosphotyrosine Phosphatase SHP-1. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 19(4): s 2903-2912.
30. Oh H. M., Lee S. G., Na B. R., Wee H., Kim S. H., Choi S. Ch., Lee K. M., Jun Ch. D.: RKIKK Motif in the Intracellular Domain Is Critical for Spatial and Dynamic Organization of ICAM-1: Functional Implication for the Leukocyte Adhesion and Transmigration. *Mol Biol Cell*, 2007,18(6): s 23226-2335.
31. Yang L., Froio R. M., Sciuto T. E., Dvorak A. M., Alon R., Luscinskas F. W.: ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood.*, 2005, 106(2): s 584-592.
32. http://www.ihcworld.com/protocols/antibody_protocols/cd54_pharmingenh.htm. Staffeno 3.1.2009.
33. Esplugues E., Sancho D., Vega-Ramos J., Matrínez-A C., Syrbe U., Hamann A., Engel P., Sánchez-Madrid F., Lauzurica P.: Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69. *J. Exp. Med.*,2003, 197(9): s 1093-1106.

34. Zhang X., Schwartz J. C. D., Almo S. C., Nathenson S. G.: Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: Insights into organization and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): s 2586-2591.
35. Bhatia S., Edidin M., Almo S. C., Nathenson S. G.: Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: Implications for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): s 15569-15574.
36. Kapsogeorgou E. K., Moutsopoulos H. M., Manoussakis M. N.: Functional Expression of a Costimulatory B7.2 (CD86) Protein on Human Salivary Gland Epithelial Cells that Interacts with the CD28 Receptor, but Has Reduced Binding to CTLA4. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: s 3107-3113.
37. Barnhart B. C., Legembre P., Pietras E., Bubici C., Franzoso G., Peter M. E.: CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.*, 2004, 23(15): s 3175-3185.
38. Lee K. H., Feig Ch., Tchikov V., Schickel R., Hallas C., Schütze S., Peter M.E., Chan A. C.: The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.*, 2006, 25(5): s 1009-1023.
39. Feig Ch., Tchikov V., Schütze S., Peter M. E.: Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.*, 2007, 26(1): s 2216231.
40. Milovic-Holm K., Kriehoff E., Jensen K., Will H., Hofmann T. G.: FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J.*, 2007, 26(2): s 3916401.
41. Gon'álons E., Barrachina M., García-Sanz J. A., Celada A.: Translational Control of MHC Class II I-A Molecules by IFN- . *The Journal of Immunology*, 1998, 161: s 1837-1843.

42. Rimsza L. M., Roberts R. A., Campo E., Grogan T. M., Bea S., Salaverria I., Zettl A., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H. K., Delabie J., Fisher R. I., Unger J. M., LeBlanc M., Staudt L. M., Jaffe E. S., Gascoyne R. D., Chan W. C., Weisenburger D. D., Greiner T., Braziel R. M., Miller T. P.: Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune-privileged site diffuse large B-cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions. *Blood.*, 2006, 107(3): s 1101-1107.
43. Zerria K., Jerbi E., Hammami S., Maaroufi A., Boubaker S., Xiong J. P., Arnaout M. A., Fathallah D. M.: Recombinant integrin CD11b A-domain blocks polymorphonuclear cells recruitment and protects against skeletal muscle inflammatory injury in the rat. *Immunology*, 2006, 119(4): s 4316440.
44. Hajishengallis G., Wang M., Harokopakis E., Triantafilou M., Triantafilou K.: *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae Proactively Modulate α_2 Integrin Adhesive Activity and Promote Binding to and Internalization by Macrophages. *Infection and Immunity*, 2006, 74(10): s 5658-5666.
45. Zen K., Babbitt B. A., Liu Y., Whelan J. B., Nusrat A., Parkos Ch. A.: JAM-C Is a Component of Desmosomes and a Ligand for CD11b/CD18-mediated Neutrophil Transepithelial Migration. *Molecular Biology of The Cell*, 2004, 15(8): s 3926-3937.
46. <http://www.cytometry.cz/cs/>. Staffleno 12.3.2009
47. Selvaraj S. K., Periandythevar P., Prasadarao N. V.: Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes Infect.*, 2007, 9(5): s 547-557.
48. Bosio M. C., Dow S. W.: *Francisella tularensis* Induces Aberrant Activation of Pulmonary Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: s 6792-6801.

49. Nasr A. B., Haithcoat J., Masterson J. E., Gunn J. S., Eaves-Pyles T., Klimpr G. R.: Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, 80: s 774-786.