

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Optimalizace protokolu pro derivaci dendritických buněk
z kostní dřeně a srovnání se slezinovými dendritickými
buňkami**

Bakalářská práce

Eliška Maršálková
Školitel: Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.
České Budějovice 2014

Maršálková E. (2014): Optimalizace protokolu pro derivaci dendritických buněk z kostní dřeně a srovnání se slezinovými dendritickými buňkami [Optimalization of the protocol for dendritic cell derivation from bone marrow and comparison with spleen dendritic cells. Bc. Thesis, in Czech] - 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ABSTRAKT

Dendritické buňky jsou hlavní antigen prezentující buňky imunitního systému. Jejich hlavní úlohou je zpracování a prezentování antigenu, a jako jediné jsou schopné vyvolat primární odpověď v naivních T buňkách.

V práci bylo zkoumáno, jaký způsob derivace buněk kostní dřeně je neoptimálnější pro získání co možná nejčistší populace dendritických buněk. Dále se porovnávala čistota, fenotyp, stupeň aktivace a množství produkovaných cytokinů v dendritických buňkách získaných ze sleziny nebo derivací z kostní dřeně.

Dendritic cells are the main antigen presenting cells of the immune system. Their primary function is to process and to present antigen, and they are the only cells that are able to trigger a primary response in naive T lymphocytes.

The aim of this study was to find out what conditions of derivation from bone marrow are most suitable for obtaining the purest population of dendritic cells. Further the purity, phenotype, levels of activation, and the amount of cytokines produced were compared in splenic cells and cells derived from bone marrow cells.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 18. 4. 2014

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, PhD., která mě po celou dobu práce trpělivě vedla, dávala mi odborné rady a připomínky, které mi ukazovaly správný směr, jakým práci vést. Také bych chtěla vyjádřit svůj vděk všem ostatním členům katedry medicínské biologie, kteří mi poradili a pomohli na cestě za dokončením této práce.

Také bych ráda poděkovala své rodině a všem ostatním, kteří mě podporovali a stáli při mně.

OBSAH:

1. Použité symboly a zkratky	1
2. Literární zpracování	2
2.1. Dendritické buňky	2
2.1.1. Historie dendritických buněk	3
2.1.2. Charakteristika dendritických buněk	3
2.1.3. Funkce dendritických buněk	6
2.1.3.1. Aktivace T buněk	6
2.1.3.2. Imunitní tolerance	7
2.1.3.3. Stimulace B buněk	7
2.1.4. Produkty dendritických buněk	7
2.1.5. Receptory dendritických buněk	8
2.2. Toll-like receptory	8
2.2.1. Funkce TLR	8
2.2.2. Jednotlivé TLR	9
2.2.3. Signalizační cesty TLR	9
3. Cíle práce	11
4. Metodická část	12
4.1. Příprava dendritických buněk	12
4.1.1. Derivace dendritických buněk z kostní dřene	12
4.1.2. Izolace dendritických buněk ze sleziny	12
4.2. Stimulace buněk TLR ligandy	13
4.3. Příprava (značení) buněk a měření na průtokovém cytometru	13
4.4. Stanovení cytokinů – ELISA	15
4.5. Statistická analýza	15
5. Výsledky	16
5.1. Optimalizace protokolu pro derivaci DC z kostní dřene	16
5.1.1. Rozdíl derivace s GM-CSF oproti derivaci s GM-CSF a IL-4	16
5.1.2. Vliv velikosti panelu	19
5.1.3. Vliv množství vyměněného média	20
5.2. Porovnání dendritických buněk izolovaných ze sleziny a derivovaných z kostní dřene	21
6. Diskuze	27

7. Závěr	30
8. Použitá a doporučená literatura	31

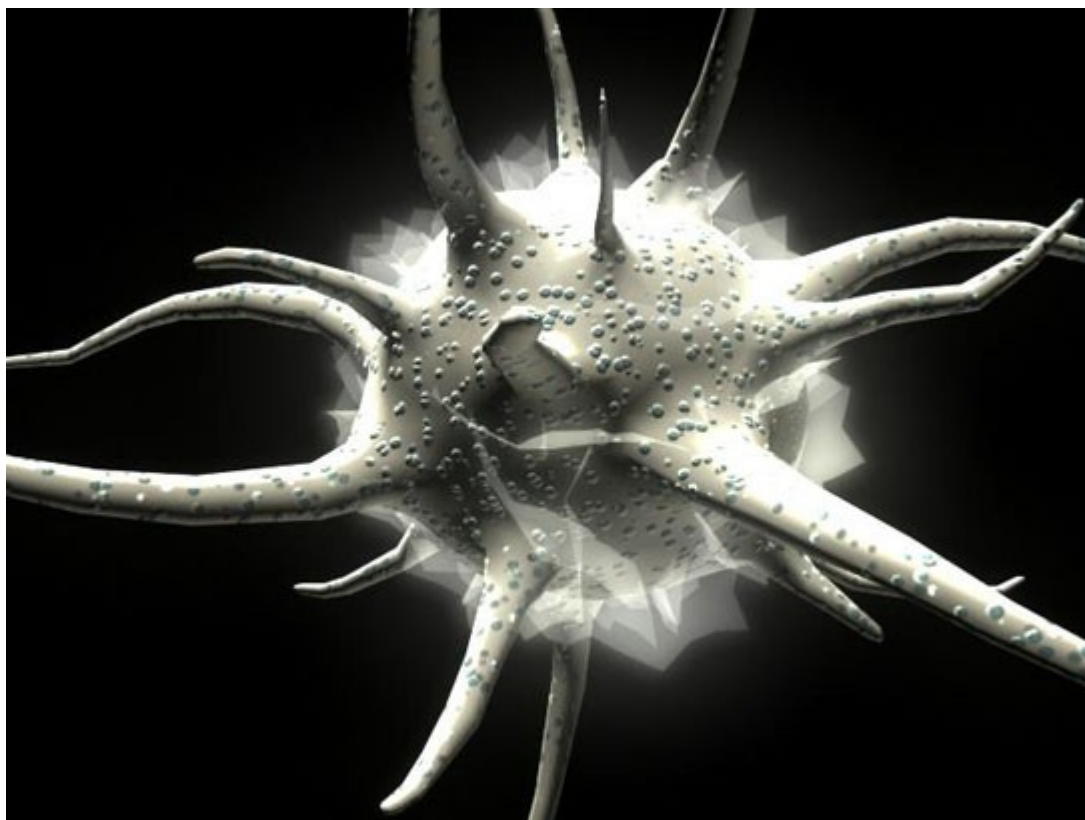
1. POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

APC	antigen prezentující buňky
CD	cluster of differentiation
CSF	colony stimulating factor
DCs	dendritické buňky
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
FDCs	folikulární dendritické buňky
Flt3L	Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
IL	interleukin
IQ	imiquimod
LPS	lipopolysacharid
LTA	lipoteichoic acid
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NKDC	natural killer dendritic cells
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PRR	pattern recognition receptor
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptory
TNF	tumor necrosis factor

2. LITERÁRNÍ ZPRACOVÁNÍ

2.1. DENDRITICKÉ BUŇKY

Dendritické buňky (DCs) jsou antigen-prezentujícími buňkami (APCs), které hrají klíčovou roli v regulaci získané imunitní odpovědi. Jsou unikátními APCs a je na ně nahlíženo jako na „profesionální“ APCs, protože jejich primární funkcí je prezentovat antigen a jen dendritické buňky mají schopnost vyvolat primární odpověď v odpočívajících naivních T-lymfocytech. Aby Dendritické buňky jsou schopné zachytit antigen, zpracovat ho a prezentovat ho na buněčném povrchu spolu s příslušnými kostimulačními molekulami. Také dopomáhají v udržování funkce B-lymfocytů a jejich paměťové odpovědi. Tímto jsou tedy dendritické buňky nezastupitelné pro zachování imunologické paměti.



Obr. 1: Dendritická buňka (zdroj: www.scitech.daily.com).

2.1.1. Historie dendritických buněk

Poprvé byl popsán podtyp DCs – Langerhansovy buňky, a to německým lékařem Paulem Langerhansem v roce 1868. Původně si myslel, že jde o typ nervových buněk kvůli jejich chapadlovitému charakteru, ale už i on si všiml, že se nedotýkají (Van Spriël & De Jong, 2013). V té době byl již publikován koncept fagocytózy makrofágy (Tuber, 2003), ale buněčná imunologie byla ještě neprozkoumaným oborem, a tak ještě nějakou dobu trvalo, než byla objevena funkce DCs.

Postupně se začalo uvažovat o tom, jaká je spojitost mezi makrofágy, kteří fagocytují antigen, a lymfocyty, které na něj reagují. Následovalo mnoho experimentů, které pomalu odhalovaly existenci APCs. Nossal et al. měli za to, že antigen je lymfocytům prezentován cytoplazmatickými výběžky (dendrity) specializovaných makrofágů. Mosier a Coppelson, a nezávisle na nich Rowley a kolegové, popsali speciální slezinnou pomocnou buňku, která se od makrofágů lišila (Van Spriël & De Jong, 2013). DCs nakonec v roce 1970 pojmenoval Steinman, který zkoumal selekci T-buněčných klonů v myší slezině. Tam objevil „nové“ buňky – DCs – nevypadaly jako makrofágy a nezprostředkovávaly tak jednoduše endocytózu (Lewis & Reizis, 2012). Ve stejné době přišel Veerman s teorií, že speciální „dendritické makrofágy“ tvoří v thymus-dependentních oblastech sleziny myší mikroprostředí, které umožňuje T-buňkám maturaci a diferenciaci - ty byly nakonec charakterizovány jako folikulární DCs (Van Spriël & De Jong, 2013). Později byly DCs rozděleny na lymfoidní a myeloidní a folikulární DCs.

2.1.2. Charakteristika dendritických buněk

Svůj název získaly DCs podle charakteristických výběžků vystupujících z jejich těla ($> 10 \mu\text{m}$), tedy dendritům. Podobají se tak nervovým buňkám, se kterými byly v budoucnosti zaměňovány (Van Spriël & De Jong, 2013). Díky těmto výběžkům jsou v kontaktu s mnoha buňkami nacházejícími se v jejich prostředí (Krejsek & Kopecký, 2004).

Buňky nenesou typické lymfocytární ani monocytární znaky. Mají nepravidelné jádro a malá jádérka. Obsahují mnoho mitochondrií, ale málo ribozómů, lysozómů a jejich endoplazmatické retikulum není příliš vyvinuto. Jejich povrch se zdá být téměř hladký – nebrzdí ho žádné záhyby, nenesou žádné mikroklky (Janeway et al., 2005).

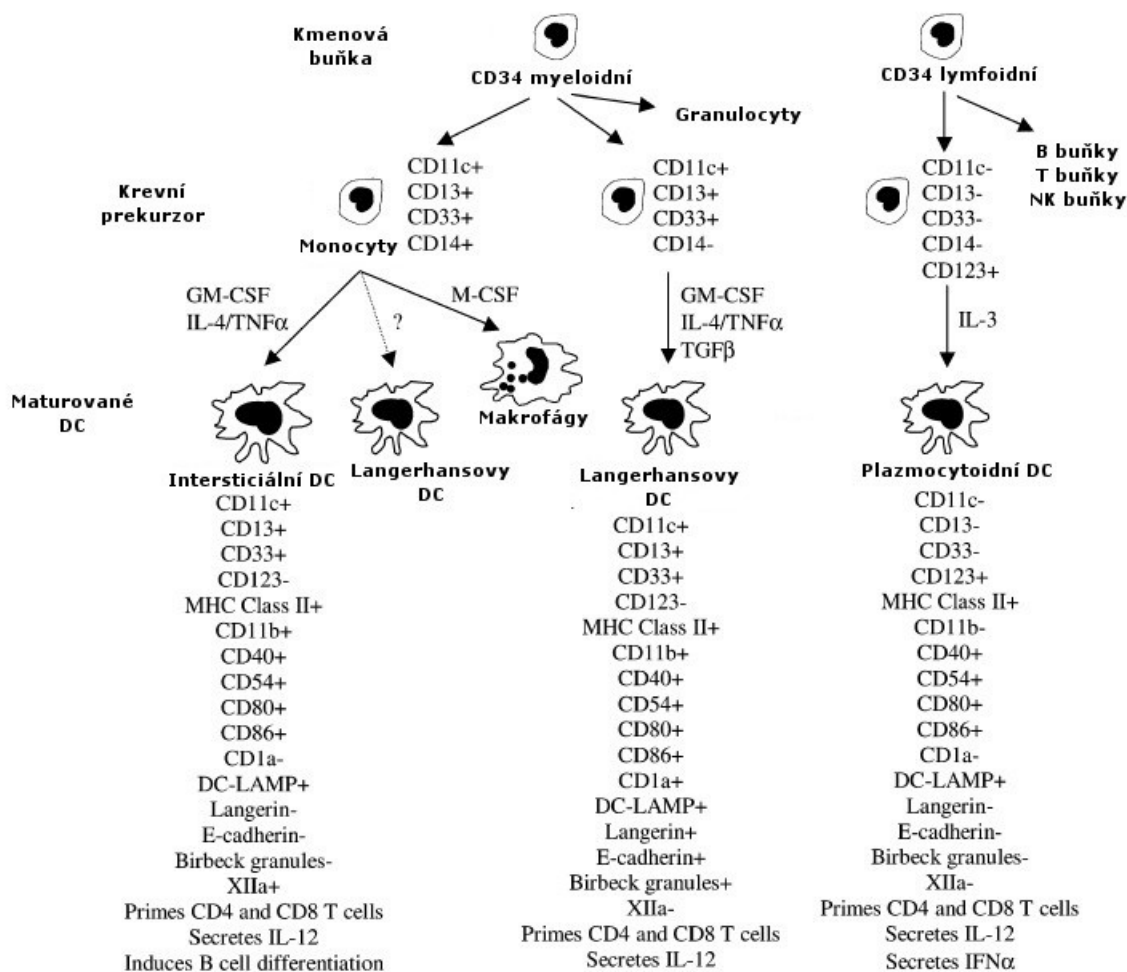
DCs se vyznačují především tím, že jsou schopné na svém povrchu exprimovat MHC I i MHC II.

Klasické DCs vznikají z CD34⁺ kmenové buňky nacházející se v kostní dřeni, odlišujeme dva subtypy podle linie, z které se vyvíjejí – lymfoidní a myeloidní (LEWIS & REIZIS, 2012). Oproti tomu FDCs, které s klasickými DCs nejsou příbuzné, ale podobají se jim funkčně i morfologicky, pocházejí z mezenchymální prekurzorové buňky (TEW et al., 1997).

Progenitorové DCs vznikají v kostní dřeni, odkud dále migrují do celého těla. Nejvíce se jich usídí v kůži a sliznicích dýchacího a trávicího ústrojí, kde tvoří 1-2% celkového počtu buněk (Hořejší & Bartůňková, 2005). V menším množství se pak dají najít všude v těle, s výjimkou mozku, rohovky a varlat (Šedivá & Stříž, 2002). Podle umístění můžeme pak DCs rozdělit na čtyři hlavní skupiny – Langerhansovy buňky, nacházející se v pokožce a mukózních membránách, intersticiální DCs, osidlující většinu orgánů jako srdce, plíce, játra, ledviny a zažívací trakt, interdigitativní DCs, které najdeme primárně v T-buněčných oblastech lymfatických tkání a dřeni brzlíku, a cirkulující DCs, kolující v krvi a lymfě (Lin et al., 2006).

V myších jsou nezralé DCs charakterizovány vysokou expresí CD11c, nižší expresí DC80 a CD86, a nízkou expresí MHC II, která může být zvýšena aktivací buňky (Granucci et al., 2005).

Expresie povrchových znaků se u různých subtypů DC liší. Schéma vývoje dendritických buněk z CD34⁺ prekurzoru lymfoidní a myeloidní linie včetně povrchových znaků a produkce cytokinů najdete na Obr. 2. Antigenní profil různých subtypů myších DCs je vyobrazen na Obr. 3.



Obr. 2: Schéma vývoje dendritických buněk z CD34⁺ prekurzoru lymfoidní a myeloidní linie, včetně cytokinů (upraveno podle Lipscomb & Masten, 2002).

	Dendritic Cell Subsets				
	CD4+8 α -	CD4-8 α +	CD4-8 α +	CD4-8 α -/low	CD4-8 α +
Phenotype					
CD11c	+	+	+	+	+
CD11b	+	-	+	-	-
CD80	+	+	+	+	+
CD86	+	+	+	+	+
CD40	Low	Low	Low	+	+
MHC class II	+	+	+	+	+
DEC205	-/Low	+	-/Low	+	+
F4/80	+	-	+	-	-
Function					
Phagocytic ability	Yes	Yes	Yes	-	-
Primes CD4/CD8 T cells	Yes	Yes	Yes	-	-
Tissue	Spleen Lymph nodes	Spleen Lymph nodes	Spleen Lymph nodes	Thymus Lymph nodes	Thymus
Localization	Marginal zones of spleen	T cell areas of lymphoid tissue	Marginal zones of spleen	T cell areas of lymph nodes	Thymic cortex

Obr. 3: Antigenní profil myších DCs ve slezině, lymfatických uzlinách a thymu (upraveno podle Lipscomb & Masten, 2002).

In vitro lze DCs získat z krevních prekurzorů použitím kombinace různých růstových faktorů, jako GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), IL-4, CSF (Colony Stimulating Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor β), IL-3 a další (Zhan et al., 2012). K derivaci DCs lze též použít růstový faktor Flt3L (Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand), přičemž přítomnost Flt3L v kultivačním médiu vede k získání lymfoidních DCs, zatímco GM-CSF podporuje růst DCs myeloidní linie (Brasel et al., 2000).

2.1.3. Funkce dendritických buněk

DCs mají tři hlavní funkce, všechny zahrnují prezentaci antigenu. První je prezentace antigenu a následná aktivace T buněk. Druhou funkcí je navození imunitní tolerance, na které se podílí zvláštní subtyp DCs, zatím blíže nepopsán. Třetí funkcí je zajištění imunologické paměti ve spolupráci s B buňkami folikulárními DCs. DCs navíc produkují mnoho cytokinů, které se podílejí na regulaci vrozené imunity.

2.1.3.1. Aktivace T buněk

DCs zpracovávají a prezentují antigen, čímž aktivují CD4+ i CD8+ T buňky. Zdá se, že to je hlavní rolí DCs, protože jen DCs jsou schopné aktivovat naivní T lymfocyty. Nezralé DCs vznikají v kostní dřeni a migrují do různých částí těla. Jakmile jsou na místě, zůstávají dormantní, dokud se nesetkají s invadujícími patogeny. Pak je jejich primární funkcí zachytit antigen. DCs jsou také přitahovány na místo zánětu, kde jsou stimulovány k zachycení a zpracování antigenu. Když je antigen zachycen, je zpracován buď endosomální cestou, nebo proteosomální cestou.

Pro prezentaci antigenu s MHC třídy I ke stimulaci CD8+ cytotoxických T lymfocytů je antigen nebo protein pohlcen fagocytózou nebo přes receptor zprostředkovanou endocytózou do cytosolu. Antigeny jsou dále zpracovány proteazomem a vstupují do endoplazmatického retikula, kde se peptidy naváží na nově nasyntetizovanou molekulu MHC I, aby mohly být prezentovány na povrchu buňky (Šedivá & Stříž, 2002).

Pro prezentaci antigenu s MHC třídy II (ke stimulaci CD4+ T pomocných buněk) jsou antigeny pohlceny fagocytózou nebo receptory zprostředkovanou endocytózou do

endosomu, kde dochází k proteolýze. Peptidy pak vstupují do vezikulu obsahujícího MHC II, na který se naváží a jsou transportovány na povrch buňky (Janeway et al., 2005).

Klíčovou komponentou DCs, kromě zachycení antigenu, jeho zpracování a prezentace, je přítomnost kostimulačních molekul na jejich povrchu. DCs na svém povrchu nesou kostimulační molekuly zahrnující členy B7 rodiny (CD80 a CD86), TNF rodiny a intracelulární adhezivní molekuly, které jsou důležité pro aktivaci T buněk (Hořejší & Bartůňková, 2005).

2.1.3.2. Imunitní tolerance

Tolerance je neschopnost imunitního systému reagovat na specifické antigeny. Centrální tolerance nastává v thymu pro T buňky a v kostní dřeni pro B buňky. Primární mechanismus pro centrální toleranci T buněk je v indukci smrti T buněk. DCs se hojně vyskytují v thymu, kde jsou nově vzniklé T buňky učeny stát se funkčními CD4⁺ T buňkami a CD8⁺ T buňkami a projdou selekcí, která eliminuje imunitu proti vlastní tkáni (Hořejší & Bartůňková, 2005). T buňky, které reagují na DCs nesoucí peptidy vlastní tělu, jsou v thymu zničeny negativní selekcí. Tento proces zahrnuje T buňky, které rozpoznávají MHC se silnou aviditou (Lewis & Reizis, 2012).

2.1.3.3. Stimulace B buněk

DCs mohou přispívat ke stimulaci B buněk v T buněčných oblastech lymfatických uzlin a germinálních centrech. DCs produkují množství cytokinů a faktorů, které jsou důležité pro aktivaci a diferenciaci B buněk. Folikulární DCs (FDCs), které se nachází v germinálních centrech lymfatických uzlin jsou důležité v zajištění imunologické paměti. FDCs se nestarají o odpověď na cizí antigeny, ale potom, co je zahájena protilátková odpověď, FDCs formují množství komplexů antigenů a protilátek. Věří se, že FDCs slouží jako „zásobárna“ pro protilátky a zdroj trvalé stimulace pro B buňky (Tew et al., 1997).

2.1.4. Produkty dendritických buněk

DCs produkují mnoho cytokinů, které ovlivňují imunitní odpověď. Sekretují interferony I. typu navozující protivirový stav; INF- γ , stimulační Th1 a tlumící Th2;

prozánětlivý IL-1 β ; IL-6 stimulující hematopoézu, Th2 a proliferaci T buněk; regulační IL-10, který tlumí aktivitu Th1 a působí imunosupresivně; IL-12 regulující Th1 cytotoxickou reaktivitu a stimulující NK buňky; IL-15 navozující produkci protilátek; IL-18 indukující aktivitu Th1; TGF- β a TNF- α (Krejsek & Kopecký, 2004)

2.1.5. Receptory dendritických buněk

DCs buď na svém povrchu nebo intracelulárně exprimují mnoho receptorů, pomocí kterých specificky vycytávají antigeny. Rozdělují se do několika skupin: TLR (Toll-like receptory), NLR (NOD-like receptory), C-lektiny, integriny a Fc-receptory (Mahnke et al., 2003).

2.2. TOLL-LIKE RECEPTORY

TLR jsou skupinou bílkovinných receptorů na povrchu cytoplazmatických nebo endosomálních membrán, které jsou schopné rozeznat cizí, nebezpečné struktury. Vyskytují se zejména u buněk imunitního systému (monocyty, makrofágy, dendritické buňky), ale i například na buňkách střevního, ledvinového a plicního epitelu. Stojí v jedné z prvních obranných linií proti patogenům a hrají důležitou roli v aktivaci vrozené imunity (Mikula et al., 2010).

TLR rozeznávají celou řadu chemických struktur specifických pro patogeny – lipopolysacharidy, lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleové kyseliny a další. Některé z nich mohou být stimulovány endogenními ligandy uvolňujícími se při stresovém nebo nekrotickém poškození tkáně. Aktivací TLR dochází ke spuštění sekrece prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a zvýšení exprese některých adhezivních a kostimulačních molekul na povrchu APC (Hořejší & Bartůňková, 2005).

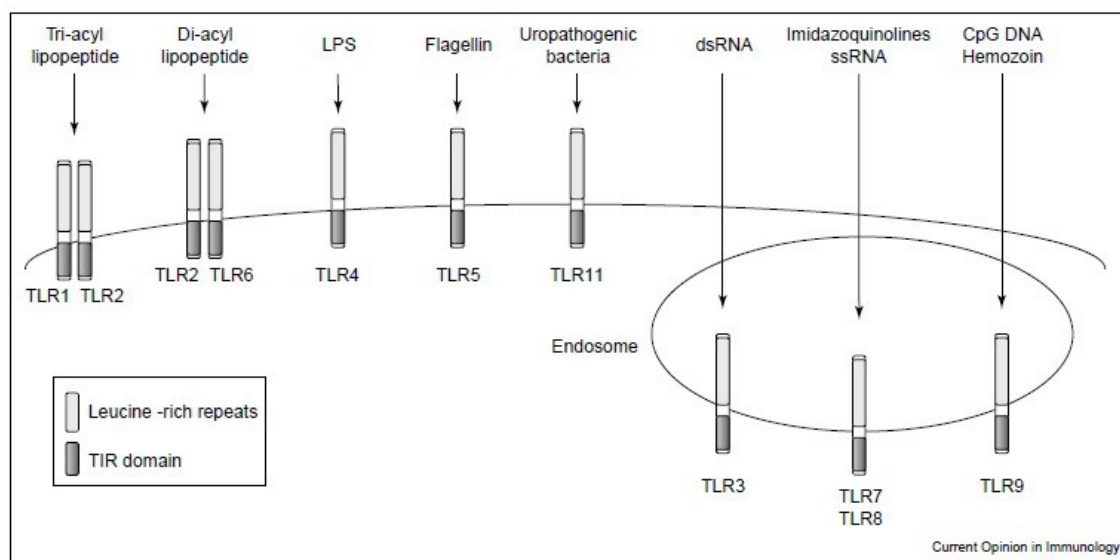
2.2.1. Funkce TLR

Odpověď vrozené imunity proti mikrobiálním patogenům je podmíněna rozeznáním specifických struktur invadujících patogenů tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). PAMPs jsou rozpoznávány omezeným množstvím PRRs (pattern recognition receptors), které exprimují makrofágy a dendritické buňky. Jako savčí PRRs se chovají právě TLR receptory (Kawai & Akira, 2005).

2.2.2. Jednotlivé TLR

Rozeznáno bylo zatím jedenáct TLR. TLR1, 2, 4, 5, 6 a 11 se nacházejí na buněčném povrchu, zatímco TLR3, 7, 8 a 9 jsou především v intracelulárních membránách (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Jako první byl objeven TLR4 rozpoznávající LPS gram-negativních bakterií. TLR2 váže peptidoglykany, lipoproteiny a lipopeptidy gram-pozitivních bakterií a mykoplasmatické lipopeptidy. TLR2 navíc spolupracuje s TLR1 a TLR6 v rozeznávání diacyl a triacyl lipopeptidů. TLR5 je aktivován flagelinem. Bylo zjištěno, že myši nemající TLR11, který je příbuzný TLR5, jsou náchylné k uropatogenickým bakteriálním infekcím (Kawai & Akira, 2005). TLR7 a TLR8 rozeznávají imidazoquinoliny - TLR7 imidazochinolim, loxoribin a broprimin, a TLR8 imidazochinolim. TLR7 a TLR8 též zprostředkovávají odpověď na jednovláknové RNA. TLR9 slouží jako receptor pro nemetylované CpG sekvence prokaryotické DNA (Hořejší & Bartůňková, 2005). Úloha TLR10 je zatím neznámá. Schéma TLR a jimi rozpoznávanými ligandy je znázorněno na Obr. 4.



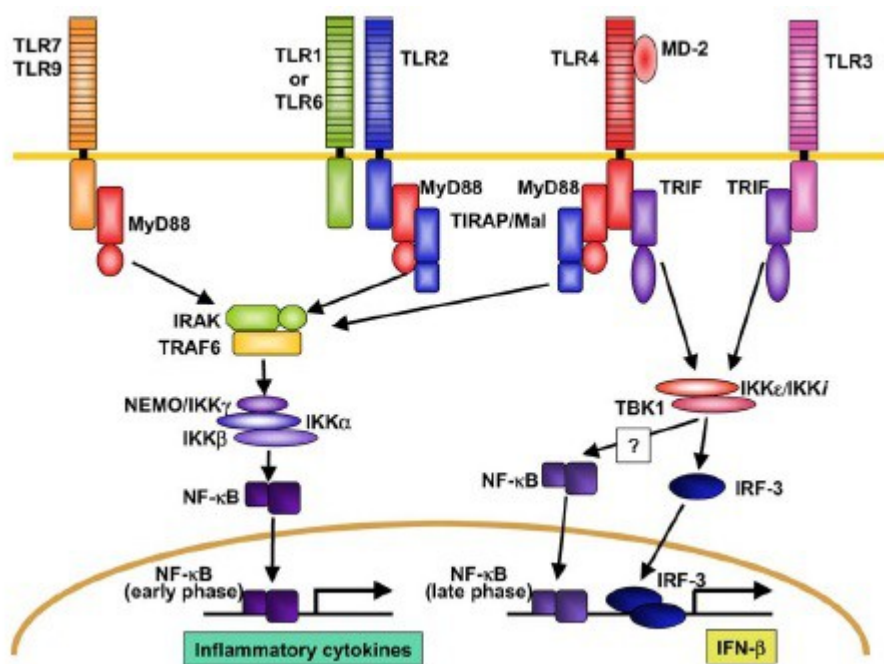
Obr. 4: TLR a jimi rozpoznávané ligandy (upraveno podle Kawai & Akira, 2005).

2.2.3 Signalizační cesty aktivované Toll-like receptory

Rozpoznání PAMPs TLR receptory spouští cytoplasmatické TIR doménově dependentní spojení s adaptéry čítající MyD88, TIRAP-MAL, TRIF-TICAM1 a TRAM-

TICAM2. Jednotlivé TLR zprostředkovávají rozdílné odpovědi spojení s různou kombinací těchto adaptérů. MyD88 je využíván všemi TLRs kromě TLR3 (Takeda & Akira, 2004).

MyD88-dependentní cestou (přes proteinové kinázy IRAK1, IRAK4 a TRAF6) je aktivován transkripční faktor NF- κ B, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů. TIRAP se uplatňuje v MyD88-dependentní cestě TLR2 a TLR4. TRIF je využit v TLR3 a TLR4 zprostředkované aktivaci transkripčního faktoru IRF3 (přes TKB1), což má za následek expresi IRF3-dependentních genů, které kódují například INF- β . TRAM specificky indukuje aktivaci IRF3 v signalizaci TLR4. TRIF využívá RIP1 a TRAF6 k aktivaci NF- κ B. Aktivace IRF7 pomocí MyD88, IRAK1 a TRAF6 zprostředkovává TLR7 a TLR9 indukovanou produkci INF- α . Aktivace IRF5 spuštěná přes MyD88 a TRAF6 indukuje produkci prozánětlivých cytokinů (Kawai & Akira, 2005). Schéma signalizačních cest TLR je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5: Schéma signalizačních cest TLR (upraveno podle Takeda & Akira, 2004).

3. CÍLE PRÁCE

1. Optimalizace protokolu derivace DCs z kostní dřeně:

- určit procento dendritických buněk derivovaných s GM-CSF oproti buňkám derivovaným s GM-CSF a IL-4 a míru kontaminace jinými typy buněk ;
- posoudit vliv velikosti panelu na derivaci.
- posoudit vliv objemu vyměňovaného média na derivaci

2. Srovnání TLR-indukované aktivity slezinových DCs a DCs derivovaných z kostní dřeně

- stanovení povrchové exprese MHCII a kostimulační molekuly CD86
- měření produkce cytokinů IL-10 a IL-12

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. PŘÍPRAVA DENDRITICKÝCH BUNĚK

Pro získání DC byly použity kostní dřev a slezina samic imbredních laboratorních myší kmene C57BL/N6 ve věku 6-10 týdnů.

4.1.1. Derivace dendritických buněk z kostní dřevě

Myš byla usmrcena zlomením vazy. Kostní dřev byla izolována z holenních a stehenních kostí a rozsuspendována v MEM (Minimal Essential Medium). Suspenze se přefiltrovala přes 70 μm BD filtr (do 50 ml centrifugačky, BD Falcon, nylon) a stočila na centrifuze (10 min, 87 g). Lýza erytrocytů se iniciovala přidáním 2 ml 0,84% NH_4Cl ohřátého na 37°C. Po 2 minutách se lýza zastavila přidáním 10 ml MEM. Buňky se spočítaly v Bürkerově komůrce, stočily a naředily v BMDC médiu (RPMI + 10% telecí fetální sérum + 50 μM 2-ME + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilin + 100 U/mL streptomycin + 2 mM glutamin s přídavkem GM-CSF, nebo GM-CSF a IL-4) na koncentraci $1 \times 10^6/\text{ml}$. Buněčná suspenze se rozkapala po 1 ml do 24-jamkového panelu (nebo po 3 ml do 6-jamkového panelu $0,4 \times 10^5/\text{ml}$) a kultivovala v CO_2 termostatu s 5% CO_2 při 37°C. Třetí a pátý den se buňkám podle potřeb experimentu měnilo médium – odebíralo se buď 50%, 70%, nebo 100% média a stejné množství nového se doplnilo. Podle potřeb experimentu obsahovalo BMDC médium pouze růstový faktor GM-CSF (30 ng/ml), nebo obsahovalo GM-CSF (30 ng/ml) a IL4 (10 ng/ml). Sedmý den bylo buňky možné nasadit na experiment. Pro účely některých experimentů se ještě od buněk izolovala populace bohatá na povrchový znak CD11c za stejného postupu jako v kapitole 4.1.2.

4.1.2. Izolace dendritických buněk ze sleziny

Myš byla usmrcena zlomením vazy. Slezina byla sterilně vyjmuta do 2 ml RPMI a rozstříhána do 5 ml RPMI s liberázou DL (0,25 mg/ml) a DNazou (0,2 mg/ml). Následovala 30 minutová inkubace při 37°C, po které se směs protlačila přes 70 μm nylonové sítko (BD Falcon). Suspenze byla přiředěna PBS/2% BOFES a stočena 10 minut při 196 g. Buněčný pelet byl rozsuspendován v 830 μl MACS pufru (PBS/2% BOFES/1mM EDTA). K buněčné suspenzi se přidalo 50 μl magnetických kuliček

konjugovaných s anti-CD11c protilátkou (výrobce MACS Miltenyi Biotec) a následovala 15-minutová inkubace na ledu v lednici. Poté se suspenze promyla desetinásobným objemem MACS pufru a stočila (10 minut, 196 g). Buňky, resuspendované v 500 μ l MACS pufru, se nanosly na kolonku, která se předem equilibrovala 3 ml MACS pufru. Následně se kolonka promyla 3 krát se 3 ml MACS pufru a po vyjmutí z magnetu se buňky eluovaly MACS pufrem. Takto izolované buňky bylo již možné rovnou nasadit na experiment.

4.2. STIMULACE BUNĚK TLR LIGANDY

Na experiment bylo nasazováno přibližně 200 000 buněk na jamku (v 200 μ l) v 96-jamkovém panelu. Buňky byly stimulovány třemi různými ligandy – LPS, LTA a IQ. Stimulace trvala zhruba 48 hodin. Použité koncentrace jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Výsledné koncentrace ligandů použitých ke stimulaci buněk.

LPS	50 ng/ml
LTA	2 μ g/ml
IQ	100 ng/ml

4.3. PŘÍPRAVA (ZNAČENÍ) BUNĚK A MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Buňky byly po celou dobu drženy na ledu. Z panelu se odsálo médium a buňky se omyly 200 μ l vychlazeným PBS. Do panelu se do každé jamky napipetovalo po 200 μ l studeného 0,005M EDTA v PBS a na 5-20 minut se buňky nechaly na ledu, než se zakulatili. Suspenze se pak odebrala do U-panelu a stočila. Supernatant se odstranil, přidalo se 200 μ l promývacího pufru (PBS + 1% BOFES) a panel se opět stočil. Supernatant se odstranil a buňky byly značeny 20 μ l protilátek rozpuštěných v promývacím pufru. Značení trvalo 20 minut, probíhalo ve tmě. Poté se buňky dvakrát promyly promývacím pufrem a byly rozsuspendovány ve 200 μ l promývacího pufru a tak připraveny na měření.

Během experimentu se používalo několik mixů protilátek řaděných podle instrukcí výrobce (eBioscience). Seznam mixů je v tabulce 2.

Tab. 2: Seznam mixů protilátek použitých pro značení na FACS.

Mix 1	CD11c-PE CD11b-FITC F4/80-PeCy7 CD86-APC MHCII-Alexa Fluor 700
Mix 2	CD11c-PE CD3-FITC CD19-APC
Mix 3	NK1.1-PE CD11c-APC Ly-G6-Alexa Fluor 700
Mix 4	CD11c-PE CD11b-FITC LyG6-Alexa Fluor 700 CD86-APC
Mix 5	CD11c-PE F4/80-PeCy7

Jako kompenzační kontroly byly použity protilátky v tabulce 3. Byly řaděny promývacím pufrem podle pokynů výrobce. Ke vzorkům určeným ke kompenzaci bylo po značení přidáno stejné množství neznačených buněk.

Tab. 3: Seznam protilátek použitých ke kompenzaci.

CD11c-PE
CD11b-FITC
CD86-APC
MHCII-Alexa Fluor 700
F4/80-PeCy7

Buňky byly měřeny na průtokovém cytometru BD Canto II a analyzovány pomocí programu Diva software 4. V experimentech se analyzovaly pouze živé singletní buňky. Na odlišení živých a mrtvých buněk se buňky barvily s propidiem jodidem.

4.4. STANOVENÍ CYTOKINŮ – ELISA

Pro stanovení množství produkovaných cytokinů byly použity kity firmy eBioscience. Při stanovení se postupovalo podle instrukcí výrobce a měřily se cytokiny IL-10 a IL-12.

4.5. STATISTICKÁ ANALÝZA

Pro zpracování výsledků byl použit t-test a grafy programu Excel.

5. VÝSLEDKY

5.1. OPTIMALIZACE PROTOKOLU PRO DERIVACI DC Z KOSTNÍ DŘENĚ

5.1.1. Rozdíl derivace s GM-CSF oproti derivaci s GM-CSF a IL-4

Byl proveden experiment, v němž byla jedna skupina buněk z kostní dřeně derivována jen s růstovým faktorem GM-CSF, zatímco druhá skupina byla derivována s GM-CSF i IL-4. Při krmení se měnilo 50% média. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaká metoda je pro derivaci efektivnější, tedy jakým způsobem získáme větší procento dendritických buněk s menší kontaminací buněk ostatních.

Vzorky se na průtokovém cytometru měřily v triplikátech a následně byly zprůměrovány. Výsledky měření jsou zapsány v tabulkách 4 a 5.

Tab. 4: Buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF, množství buněk pozitivní na vybrané povrchové znaky je zapsáno v procentech.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	celkem
CD11c ⁺		85,2	85,2
CD11b ⁺	5,3	81,5	86,8
F4/80 ⁺	1,2	39,2	40,4
CD86 ⁺	0,3	11,4	11,7
MHCII ⁺	0,7	25,35	26,05
CD3 ⁺	0,05	4,8	4,85
CD19 ⁺	0,45	5	5,45
NK 1.1 ⁺	2,85	13,1	15,95
LyG6 ⁺	43,9	40,75	84,65

Tab. 5: Buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF a cytokinem IL-4, množství buněk pozitivních na vybrané povrchové znaky je zapsáno v procentech.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	celkem
CD11c ⁺		79,35	79,35
CD11b ⁺	0,6	57	57,6
F4/80 ⁺	2,95	48,1	51,05
CD86 ⁺	8,15	42,85	51
MHCII ⁺	13	56,1	69,1
CD3 ⁺	0,1	3,4	3,5
CD19 ⁺	0,4	6,5	6,9
NK 1.1 ⁺	13,8	22,8	36,6
LyG6 ⁺	22,75	37,05	59,8

Z tabulek je vidět, že populace buněk charakterizovaná jako maturované dendritické buňky, tedy pozitivní na povrchové znaky CD11c a MHCII (Inaba et al., 1992), je výrazně vyšší u buněk derivovaných s GM-CSF a IL-4. Nematurované myeloidní dendritické buňky, pozitivní na CD11c a CD11b (Brasel et al., 2000), jsou ovšem vyšší u buněk derivovaných pouze s GM-CSF. Z toho se dá usuzovat, že použitím IL-4 dochází k rychlejší maturaci buněk.

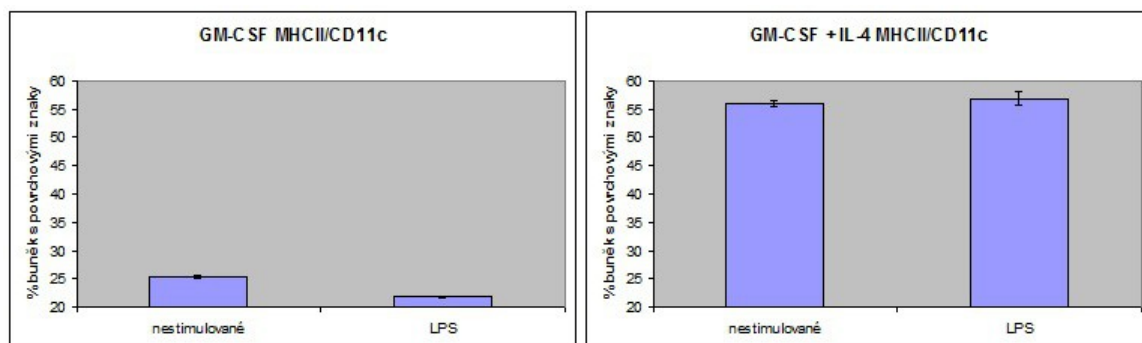
Při derivaci pouze s GM-CSF se ve vzorcích také objevuje větší množství granulocytů (cca o 10%), buněk pozitivních na povrchový znak LyG6. Zhruba polovina z granulocytů v obou skupinách je i CD11c pozitivní. Nález granulocytů ve vzorcích je normální, neboť růstový faktor GM-CSF podporuje i jejich růst.

Kontaminace T-lymfocyty, pozitivních na CD3, a B-lymfocyty, pozitivních na CD19, je u obou skupin téměř stejná.

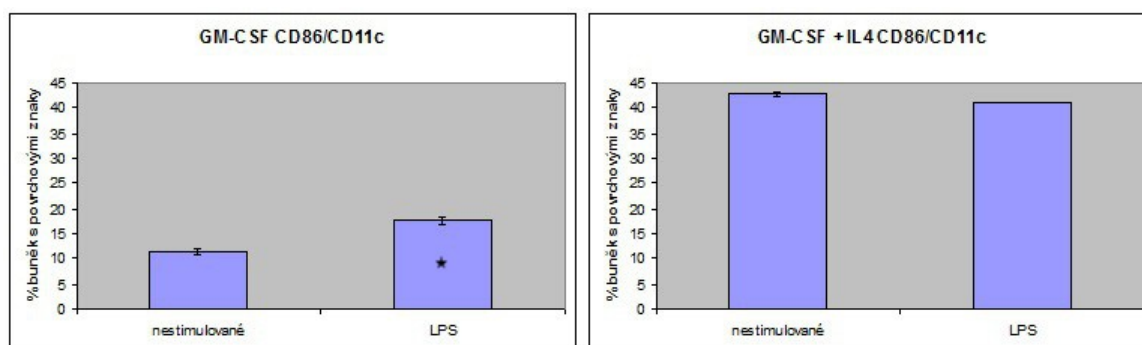
Kontaminace NK-buňkami, pozitivními na povrchový znak NK1.1, je pozorovatelná vyšší při derivaci s GM-CSF a IL-4. Spolu s klasickými NK buňkami ve vzorcích podobně vzrůstá i počet NKDCs, charakterizovaných expresí NK1.1 a zároveň CD11c. Tyto buňky jsou subtypem dendritických buněk a mají vlastnosti buněk dendritických i NK (Chen et al., 2007).

Expresie makrofágového povrchového znaku F4/80 je vyšší při derivaci s GM-CSF a IL-4. Většina buněk exprimujících tento povrchový znak je ovšem zároveň CD11c pozitivní, nedá se tedy zcela jistě říci, zda se jedná o makrofágy, nebo subset dendritických buněk (Krüger et al., 2004).

Stupeň aktivace dendritických buněk se odhadoval pomocí exprese molekul MHCII a CD86 spolu s povrchovým znakem CD11c. Výsledky jsou vyobrazeny na obrázcích 6 a 7.



Obr. 6: Buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF a buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF a cytokinem IL-4, pozitivní na povrchové znaky MHCII a CD11c.

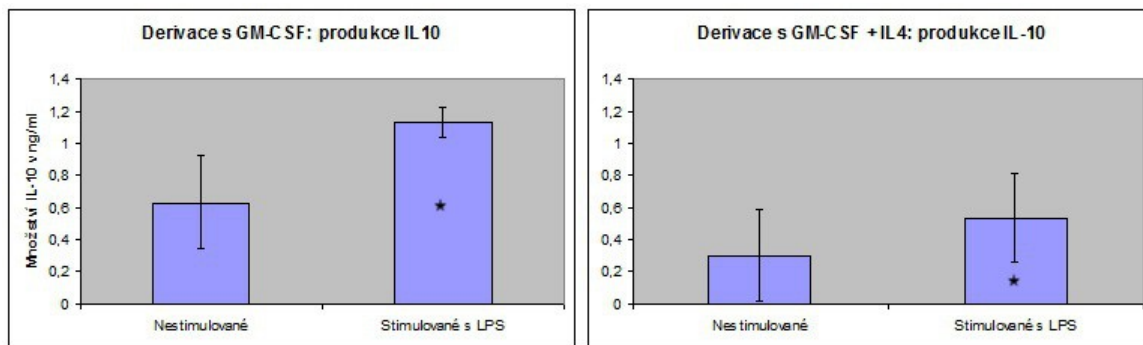


Obr.7: Buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF a buňky derivované s růstovým faktorem GM-CSF a cytokinem IL-4, pozitivní na povrchové znaky CD86 a CD11c (* - statisticky významné).

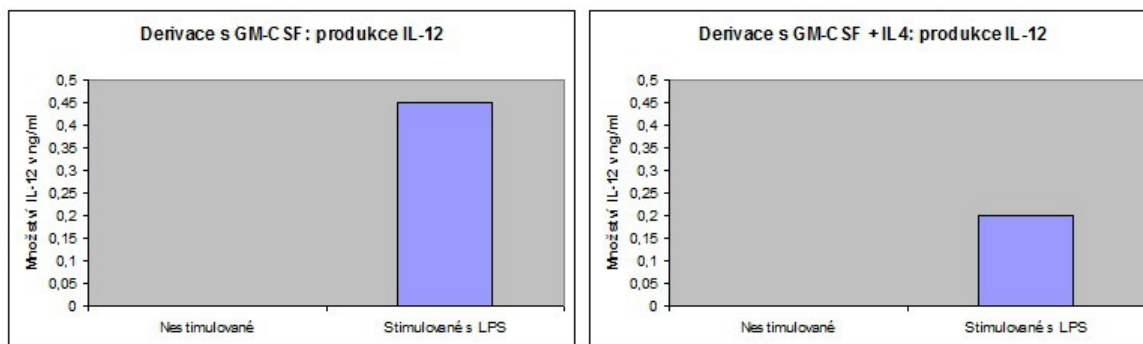
Z obrázků je vidět, že u dendritických buněk derivovaných pouze s GM-CSF po stimulaci stoupá exprese molekul CD86 (cca o 6 %). Očekávaný nárůst MHCII na povrchu buněk nebyl pozorován.

U dendritických buněk derivovaných s GM-CSF a IL-4 naopak exprese molekul CD86 po stimulaci s LPS zvýšena nebyla. Exprese MHCII molekul se zvýšila o 1 procento.

U buněk bylo dále měřeno množství produkovaných cytokinů u nestimulovaných a stimulovaných buněk. Výsledky jsou vyobrazeny na obrázcích 8 a 9.



Obr. 8: Množství produkovaného cytokinu IL-10 u buněk derivovaných s GM-CSF a u buněk derivovaných s GM-CSF a IL-4 (* - statisticky významné).



Obr. 9: Množství produkovaného cytokinu IL-12 u buněk derivovaných s GM-CSF a u buněk derivovaných s GM-CSF a IL-4.

Z obrázků je vidět, že k větší sekreci obou cytokinů došlo u buněk derivovaných s GM-CSF. Po jejich stimulaci s LPS se produkce ještě zvýšila, což ukazuje na to, že u nich došlo k aktivaci.

Buňky derivované s GM-CSF a IL-4 produkovaly cytokinů zhruba o polovinu méně než buňky derivované pouze s GM-CSF. Po jejich stimulaci LPS se sekrece opět zvýšila, ovšem ne tak markantně jako u předchozí skupiny. To poukazuje na to, že buňky derivované s IL-4 maturují již během derivace a stimulací LPS tedy nedochází k takovým změnám.

5.1.2. Vliv velikosti panelu

Byl proveden experiment, při němž se buňky izolované z kostní dřeně rozdělili do dvou skupin. Buňky byly derivovány na 6-jamkovém a 24-jamkovém panelu a při jejich krmení

se odebíralo 70% média. Po derivaci byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru a získané hodnoty jsou zapsány v tabulce 6.

Tab. 6: Množství buněk pozitivních na povrchové znaky, 6-jamkový a 24-jamkový panel, odebíráno 70% média, výsledky jsou zapsány v procentech.

6-jamkový	CD11c ⁻	CD11c ⁺	24-jamkový	CD11c ⁻	CD11c ⁺
CD11c ⁺		37,1	CD11c ⁺		44,1
CD11b ⁺	35,6	34,7	CD11b ⁺	27,2	41,6
MHCII ⁺	7,1	10,8	MHCII ⁺	6,9	9,5
NK 1.1 ⁺	3,5	13,6	NK 1.1 ⁺	2,6	7,9
LyG6 ⁺	33,8	34,3	LyG6 ⁺	11,4	20,2

Z hodnot je vidět, že při použití vícejamkového panelu dostaneme více CD11c pozitivních buněk, i když procento buněk pozitivních na CD11c a zároveň MHCII je o trochu menší.

Množství derivovaných granulocytů, pozitivních na LyG6, je markantně větší (zhruba dvakrát tolik) u buněk derivovaných v 6-jamkovém panelu. I kontaminace NK buňkami, pozitivními na NK1.1, je v 6-jamkovém panelu větší, a stoupá i procento NKDC buněk, pozitivních na NK1.1 a zároveň na CD11c.

Z výsledků lze říci, že použití 24-jamkového panelu je lepší, neboť tak dostaneme více CD11c pozitivních buněk a snížíme množství granulocytů i NK1.1 pozitivních buněk.

5.1.3. Vliv objemu vyměněného média

Buňky deriované z kostní dřeně se rozdělily do dvou skupin. Buňky byly derivovány na 24-jamkovém panelu a při jejich krmení se odebíralo 100% nebo 70% média. Po derivaci byly buňky zanalyzovány na průtokovém cytometru a získané hodnoty jsou zapsány v tabulce 7.

Tab. 7: Množství buněk pozitivních na povrchové znaky, 6-jamkový panel, odebíráno 100% nebo 70% média, výsledky jsou zapsány v procentech.

100% média	CD11c ⁻	CD11c ⁺	70% média	CD11c ⁻	CD11c ⁺
CD11c ⁺		36,9	CD11c ⁺		44,1
CD11b ⁺	28,1	34,2	CD11b ⁺	27,2	41,6
MHCII ⁺	8,5	10,9	MHCII ⁺	6,9	9,5
NK 1.1 ⁺	3,2	10,5	NK 1.1 ⁺	2,6	7,9
LyG6 ⁺	20,6	24,7	LyG6 ⁺	11,4	20,2

Z hodnot je poznat, že při odebírání 70% média při krmení dostaneme větší množství CD11c pozitivních buněk, ačkoliv exprese MHCII molekul je zanedbatelně menší.

Při odebírání 100% média při krmení se ve vzorcích objevuje větší procento granulocytů, pozitivních na molekulu LyG6, rovněž větší množství NK buněk, pozitivních na NK1.1 povrchový znak, a i NKDC buněk, pozitivních na NK1.1 a zároveň na CD11c.

Lze tedy usuzovat, že odebíráním 70% média při krmení namísto 100%, dostaneme více CD11c pozitivních buněk a snížíme počet vyderivovaných granulocytů i NK1.1 pozitivních buněk.

5.2. POROVNÁNÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK IZOLOVANÝCH ZE SLEZINY A DERIVOVANÝCH Z KOSTNÍ DŘENĚ

Pro porovnání rozdílů mezi dendritickými buňkami derivovanými z kostní dřeně a izolovanými ze sleziny bylo provedeno několik experimentů.

Buňky izolované z kostní dřeně byly derivovány s GM-CSF a při krmení jim bylo odebíráno 50% média a stejné množství nového přidáno. Po derivaci byly buňky pročištěny na koloně, abychom získali co nejvíce CD11c pozitivních buněk.

Výsledky měření vzorků na průtokovém cytometru jsou zapsány v tabulkách: v tabulce 8 je procentuální zastoupení buněk derivovaných z kostní dřeně pozitivních na vybrané znaky před použitím kolony; v tabulce 9 je totéž po použití kolony.

Tab. 8: Množství buněk derivovaných z kostní dřeně pozitivních na vybrané znaky před použitím kolony, výsledky jsou zapsány v procentech.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	Celkem
CD11c ⁺		57,4	57,4
CD11b ⁺	7,6	28	35,6
F4/80 ⁺	0,3	30	3,3
CD86 ⁺	4,3	9,5	13,8
MHCII ⁺	18,2	30,9	49,1
CD3 ⁺	0	0	0
CD19 ⁺	0,3	0,1	0,4
NK 1.1 ⁺	1,1	4,6	5,7
LyG6 ⁺	6,2	10,1	16,3

Tab. 9: Množství buněk derivovaných z kostní dřeně pozitivních na vybrané znaky po použití kolony, výsledky jsou zapsány v procentech.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	Celkem
CD11c ⁺		95,8	95,8
CD11b ⁺	1,1	68,3	69,4
F4/80 ⁺	0	36	36
CD86 ⁺	1	14,3	15,3
MHCII ⁺	3	57,1	60,1
CD3 ⁺	0	0	0
CD19 ⁺	0	0	0
NK 1.1 ⁺	0,2	8,8	9
LyG6 ⁺	0,6	10,8	11,4

Z tabulek 8 a 9 je vidět, že použití kolony pozitivně ovlivnilo čistotu dendritických buněk. Stouplo jak procento CD11c pozitivních buněk, tak i procento buněk pozitivních na znaky CD11b, CD86 a MHCII.

Slezinové dendritické buňky byly k experimentu připraveny způsobem popsáním v kapitole 4.1.2. Procentuální zastoupení buněk, pozitivních na testované povrchové znaky, izolovaných ze sleziny je uvedeno v tabulce 10. Pro porovnání je taktéž uvedeno procentuální zastoupení buněk po derivaci z kostní dřeně (viz tabulka 11). Buňky byly analyzovány dva dny po založení (tyto populace sloužily jako kontroly – nestimulované buňky).

Tab. 10: Procentuální zastoupení buněk derivovaných z kostní dřeně pozitivních na vybrané povrchové znaky.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	Celkem
CD11c ⁺		57,95	57,95
CD11b ⁺	0,8	3,4	4,2
F4/80 ⁺	2,85	2,6	5,45
CD86 ⁺	18,85	15,85	34,7
MHCII ⁺	20,1	37,4	57,5
CD3 ⁺	0,4	1,3	1,7
CD19 ⁺	2,1	1,65	3,75
NK 1.1 ⁺	7	4,8	11,8
LyG6 ⁺	4,15	6,2	10,25

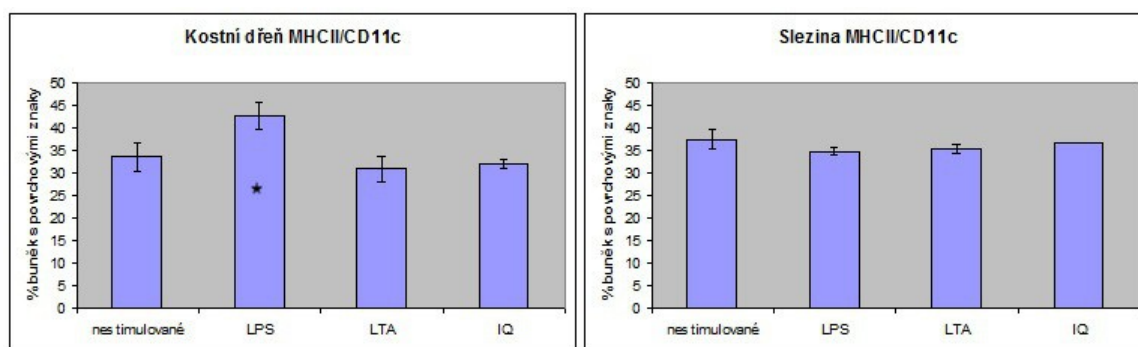
Tab. 11: Procentuální zastoupení buněk izolovaných ze sleziny pozitivních na vybrané povrchové znaky.

	CD11c ⁻	CD11c ⁺	Celkem
CD11c ⁺		74,1	74,1
CD11b ⁺	13,13	70,17	83,3
F4/80 ⁺	0,2	32	32,2
CD86 ⁺	6,7	9,3	16
MHCII ⁺	15,07	35,54	50,61

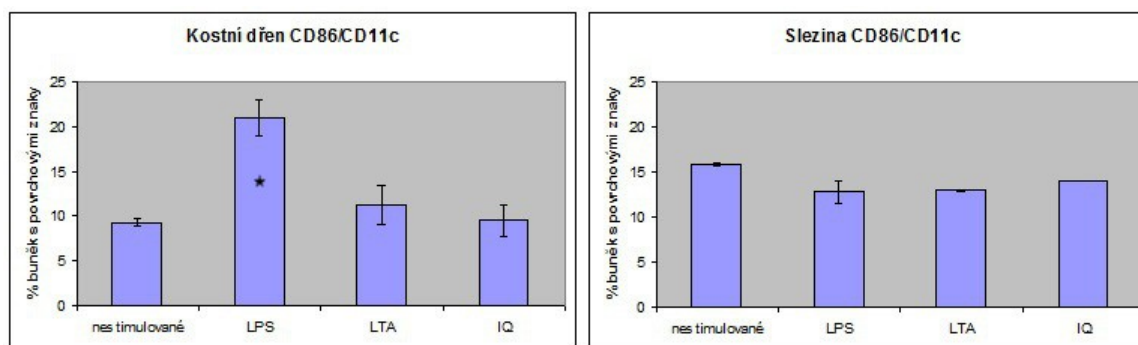
Když porovnáme buňky derivované z kostní dřeně a izolované ze sleziny, jeden z nejzásadnějších rozdílů je v expresi CD11b – na buňkách z kostní dřeně byla exprese vysoká, na slezinových buňkách minimální. Vzhledem ke skutečnosti, že GM-CSF podporuje růst myeloidní linie dendritických buněk, vysoká pozitivita na CD11b znak byla očekávána. Exprese CD86 je výrazně vyšší na slezinových buňkách (34,7 % versus 16%) a exprese MHCII je také mírně zvýšena (57,5 % versus 50,61 %). Procentuální zastoupení buněk pozitivních na znaky pro T a B lymfocyty (CD3 a CD19) a NK buňky (NK1.1) se bylo u obou typů buněk podobné, stejně tak jako zastoupení granulocytů (LyG6) (porovnávaly se hodnoty v tabulkách 9 a 10). Makrofágový znak F4/80 je buňkami izolovanými ze sleziny exprimován minimálně, avšak u buněk derivovaných z kostní dřeně je, jako u předešlých experimentů, exprimován v poměrně vysokém množství.

Slezinové buňky a DCs derivované z kostní dřeně (přečištěné na koloně) byly aktivované s TLR ligandy.

Stupeň aktivace dendritických buněk se určoval měření povrchové exprese molekul MHCII a CD86 v populaci buněk pozitivních na CD11c znak. Výsledky jsou vyobrazeny na grafech 10 a 11.



Obr. 10: Buňky derivované z kostní dřeně a buňky izolované ze sleziny, pozitivní na MHCII a CD11c znaky (* - statisticky významné).



Obr. 11: Buňky derivované z kostní dřeně a buňky izolované ze sleziny, pozitivní na CD86 a CD11c znaky (* - statisticky významné).

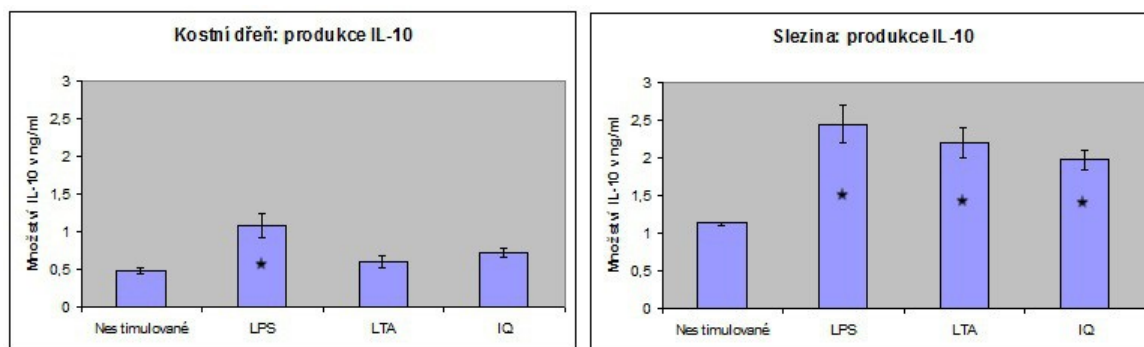
U buněk derivovaných z kostní dřeně bylo při stimulaci s LPS pozorováno zvýšení exprese MHCII na CD11c pozitivních buňkách (o 9%). Při stimulaci s TLR ligandy LTA a IQ zvýšení pozorováno nebylo. U buněk izolovaných ze sleziny po stimulaci k nárůstu exprese MHCII vůbec nedošlo.

U buněk derivovaných z kostní dřeně bylo při stimulaci s LPS pozorováno zvýšení exprese CD86 na CD11c pozitivních buňkách (cca o 12%), k nepatrnému zvýšení došlo i při stimulaci s LTA (o 1%), avšak při stimulaci s IQ zvýšení exprese zaznamenáno

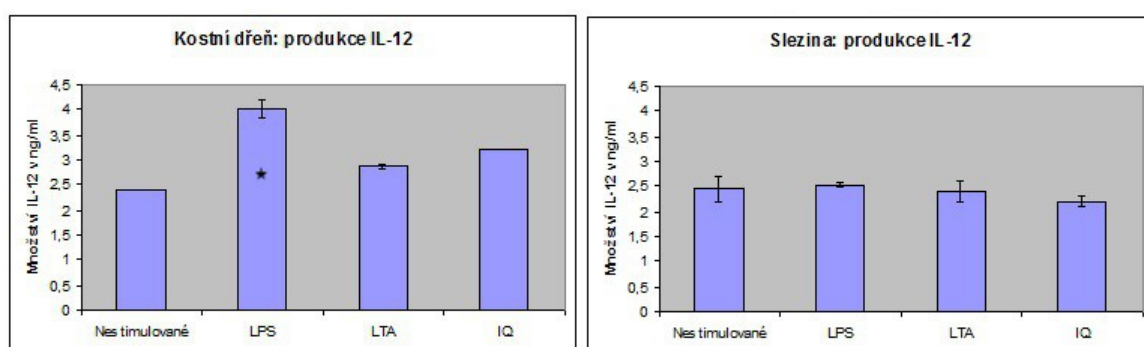
nebylo. U buněk izolovaných ze sleziny po stimulaci k nárůstu exprese CD86 vůbec nedošlo.

Z výsledků se dá vyvodit, že buňky derivované z kostní dřeně se stimulací s LPS aktivují a exprimují na svém povrchu více MHCII i CD86, na ostatní TLR ligandy ovšem moc nereagují. U buněk izolovaných ze sleziny se exprese MHCII a CD86 po stimulaci s TLR ligandy vůbec nemění. Můžeme tedy přepokládat, že buňky jsou již maturované a po stimulaci nedochází k žádné další aktivaci.

U buněk derivovaných z kostní dřeně a izolovaných ze sleziny se dále měřilo množství produkovaných cytokinů u nestimulovaných a stimulovaných buněk. Výsledky měření jsou zobrazeny na obrázcích 12 a 13.



Obr. 12: Množství produkovaného cytokinu IL-10 u dendritických buněk derivovaných z kostní dřeně a slezinových dendritických buněk (* - statisticky významné).



Obr. 13: Množství produkovaného cytokinu IL-12 u dendritických buněk derivovaných z kostní dřeně a slezinových dendritických buněk (* - statisticky významné).

Z obrázků je vidět, že produkce IL-10 se po stimulaci TLR ligandy zvýšila u obou vzorků, nejvyšších hodnot se dosáhlo stimulací LPS. Produkce cytokinu IL-10 produkovali slezinné buňky o více než 50% více.

Produkce IL-12 byla vyšší u buněk derivovaných z kostní dřeně. Po stimulaci s TLR ligandy se produkce ještě zvýšila, nejvyšší byla po stimulaci s LPS. U buněk izolovaných se sleziny se produkce IL-12 po stimulaci TLR ligandy vůbec nezvýšila.

6. DISKUZE

Dendritické buňky jsou populací značně heterogenních buněk nesoucích několik společných znaků. Když opomineme vývojově nepříbuzné folikulární dendritické buňky (TEW et al., 1997), jsou si všechny dendritické buňky podobné hlavně společnou expresí molekul CD11c, CD80, CD86 a MHCII. Naopak se od sebe jednotlivé subsety liší expresí CD11b, CD40 a F4/80. Jednotlivé typy se též liší schopností fagocytózy a lokalizací ve tkáni. Následkem toho jsou nakonec i různé funkční vlastnosti (Lipscomb & Masten, 2002).

V této práci jsem se snažila najít co neoptimálnější způsob derivace DC z kostní dřeně. Čistota DC byla posuzována procentuálním zastoupením buněk pozitivních na specifické vyselektované znaky. Povrchový znak CD11c se na dendritických buňkách nachází ve velkém množství, ale objevuje se i na jiných buňkách myeloidní linie. Povrchový znak CD11b se nachází na dendritických a NK buňkách, v určitém množství je však exprimován i monocyty, granulocyty a makrofágy (Janeway et al., 2005). Povrchový znak NK1.1 zase nemusí být exprimován na všech NK buňkách (Montaldo et al., 2013). Makrofágový povrchový znak F4/80 je obvykle exprimován na různých makrofázích (Kupfferových buňkách, slezinových buňkách červené pulpy, mikroglíích, Langerhansových buňkách a dalších), ale jeho exprese závisí i na vývojovém stádiu makrofágů a může se objevit i na některých subsetech dendritických buněk (Krüger et al., 2004). Pro úplně přesné stanovení jednotlivých buněk by se tedy musely použít kombinace více povrchových znaků charakterizujících jednotlivé buňky.

Derivace dendritických buněk z kostní dřeně se dá provádět několika způsoby, v našem případě byla zvolena derivace s růstovým faktorem GM-CSF. Tímto způsobem je možné získat velké množství dendritických buněk v jejich nematurovaném stádiu, avšak použitím GM-CSF se stimuluje růst celé myeloidní linie – tedy dendritických buněk, makrofágů a granulocytů (Inaba et al., 1992). Derivací s GM-CSF tedy dostaneme hlavně myeloidní dendritické buňky. Dalším způsobem je derivace s Flt3-ligandem: derivací s tímto cytokinem je možné získat dendritické buňky myeloidní i lymfoidní linie (Brasel et al., 2000). Některé studie též ukazují, že při různých koncentracích telecího fetálního séra v médiu dochází ke změně kvality a kvantity dendritických buněk derivovaných z kostní dřeně. Bylo zjištěno, že i stejné typy séra od různých výrobců mají jiné vlastnosti a že v séru jsou jak aktivující, tak inhibující složky (Lutz & Rössner, 2007). Použití cytokinu IL-4 při derivaci se používá hlavně k získání lidských dendritických

buněk, neboť se tak zabrání růstu makrofágů, u buněk derivovaných z kostní dřeně myši se však tento efekt neprokázal. IL-4 při derivaci ovšem podle všeho zvyšuje schopnost produkce IL-12 po stimulaci s LPS (Menges et al., 2005).

Z našich experimentů vyplývá, že použitím IL-4 při derivaci dochází k rychlejší maturaci a menšímu výskytu buněk s povrchovými znaky NK1.1 a LyG6. Zároveň je u těchto buněk i vyšší exprese F4/80, což poukazuje na to, že použití IL-4 při derivaci opravdu nezabrání nárůstu makrofágové populace (Menges et al., 2005). Granulocytů se víc vyskytovalo ve vzorcích derivovaných pouze s GM-CSF. Výskyt granulocytů je při derivaci buněk s GM-CSF normální (Hořejší & Bartůňková, 2005), snížení množství u derivace s IL-4 může být způsobeno různou maturací a reakcí na tento cytokin. Produkce cytokinů potvrzuje hypotézu, že u buněk derivovaných s IL-4 dochází k rychlejší maturaci, neboť produkce cytokinů je menší a po stimulaci s LPS se již dále nezvedá. Je také zajímavé, že nedávno popsaná hybridní populace neutrofilů, nesoucí jak znaky neutrofilů, tak znaky antigen prezentujících buněk (CD80, CD86 a MHCII), může kontaminovat populaci DC (Geng et al., 2013). Ke snížení kontaminace granulocyty by mohlo přispět prodloužení času derivace na 10-12 dnů (Lutz et al., 1999).

Při zkoumání, který panel je k derivaci dendritických buněk z kostní dřeně lepší, jsme došli k závěru, že 24-jamkový panel se hodí lépe. Vyhnete se tak většímu počtu LyG6 a NK1.1 pozitivních buněk. Větší množství těchto buněk může být způsobeno vznikem mikroprostředí uprostřed větších jamek panelu.

Při porovnávání DCs izolovaných ze sleziny a DCs derivovaných z kostní dřeně se ukázalo, že buňky derivované z kostní dřeně mají zvýšenou expresi CD11b a F4/80 znaků, což souhlasí s jinými studii (Hey & O'Neill, 2012). Na stimulaci LPS pak lépe reagují buňky derivované z kostní dřeně, což nasvědčuje tomu, že se po ní buňky aktivují – vzrůstá množství buněk pozitivních na CD11c a zároveň na MHCII, stejně tak jako pozitivních na CD11c a zároveň na CD86. Stejně tak u nich po stimulaci vzrůstá produkce obou sledovaných cytokinů. Větší množství produkovaných cytokinů dendritickými buňkami derivovanými z kostní dřeně u experimentu (5.2.) oproti experimentu předchozímu (5.1.) může být způsobeno větším množstvím těchto buněk po použití kolony pro získání CD11c pozitivních buněk. U buněk izolovaných ze sleziny se po stimulaci množství buněk pozitivních na CD11c a zároveň na CD86 a pozitivních na CD11c a zároveň na MHCII nezvyšuje, což svědčí o jejich již maturovaném stavu. Po stimulaci TLR ligandy se u slezinných buněk zvýšila pouze produkce cytokinu IL-10. Nezvýšená sekrece cytokinu IL-12 po stimulaci může být způsobena tím, že tento cytokin je obvykle

vytvářen CD8 pozitivními dendritickými buňkami, kterých se ve slezině nachází málo (Hochrein et al., 2001).

Cílem práce bylo najít neoptimálnější podmínky pro derivaci DC z kostní dřeně. Na základě našich experimentů se dá usoudit, že čistota populace DC je variabilní i v případě dodržování stejných experimentálních podmínek. Odebírání supernatantu s neadherovanými buňkami mělo snížit kontaminaci granulocyty (Inaba, 1992). Zdá se však, že zároveň snížilo i množství prekurzorů dendritických buněk a tudíž se tento postup neosvědčil. Předpokládáme, že jiné parametry, jako např. snížení koncentrace buněk zakládaných do panelu a délka derivace mohou zvýšit čistotu DCs využívaných dále pro experimenty *ex vivo*.

7. ZÁVĚR

Celkové procento vyderivovaných dendritických buněk, charakterizovaných jako buňky pozitivní na CD11c a MHCII, je vyšší při použití GM-CSF a IL-4, avšak procento buněk identifikovaných jako nematurované myeloidní dendritické buňky, charakterizované znaky CD11c a CD86, je vyšší při použití pouze růstového faktoru GM-CSF. Buňky derivované z kostní dřeně pouze růstovým faktorem GM-CSF jsou však více kontaminované granulocyty než při použití kombinace GM-CSF a IL-4. Procento buněk s NK1.1 znakem, tedy NK-buněk a NKDC, s použitím IL-4 při derivaci stoupá. Produkce cytokinů při použití IL-4 klesá. Podle výsledků se tedy zdá, že při derivaci buněk s kostní dřeně s GM-CSF a IL4 sice snížíme počet nechtěně vyderivovaných granulocytů, avšak dojde tak i k rychlejší maturaci buněk, které se pak po stimulaci obtížněji aktivují a produkují méně cytokinů.

Pro derivaci DC z kostní dřeně je ideálnější použití 24-jamkového panelu a výměna 70% kultivačního média.

DC derivované z kostní dřeně jsou pro sledování aktivace s TLR ligandy vhodnější než slezinové dendritické buňky, ať už při měření exprese povrchových znaků nebo produkce cytokinů. Jsou však více kontaminovány granulocyty.

8. POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA

Brasel K., De Smedt T., Smith J. L., Maliszewski C. R. : *Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures*. Blood 2000; 96(9):3029-39

Ferenčík M., Rovenský J., Matĥa V., *Dictionary of Immunology*, Slovak Academic Press 2000, 258s., ISBN 80-88908-63-9

Geng S., Matsushima H., Okamoto T., Yao Y., Lu R., Page K., Blumenthal R. M., Ward N. L., Miyazaki T., Takashima A. : *Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice*. Blood 2013; 121(10):1690-700

Granucci F., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P. : *Dendritic Cell Biology*. Advances in Immunology 2005; 88:193-233

Hey Y. Y., O'Neill H. C. : *Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function*. Journal of cellular and molecular medicine 2012; 16(11):2611-9

Hochrein H., Shortman K., Vremec D., Scott B., Hertzog P., O'Keeffe M. : *Differential production of IL-12, INF-alpha, and INF-gama by mouse dendritic cell subsets*. Journal of Immunology 2001; 166(9):5448-55

Hořejší V., Bartůňková J., *Základy imunologie*, Triton, 2005, 279s., ISBN 80-7254-686-4

Chen L., Calomeni E., Wen J., Ozato K., Shen R., Gao J. X. : *Natural killer dendritic cells are an intermediate of developing dendritic cells*. Journal of leukocyte biology 2007; 81(6):1422-33

Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M. : *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. The Journal of Experimental Medicine 1992; 176(6):1693-702

Janeway Ch. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J., *Immuno Biology: the Immune System In Health and Disease*, Garland Science Publishing, 2005, 823s., ISBN 0-8153-4101-6

Kawai T., Akira S. : *Pathogen recognition with Toll-like receptors*. Current Opinion in Immunology 2005; 17(4):338-44

Krejsek J., Kopecký O., *Klinická imunologie*, 2004, Nucleus, 941 s., ISBN: 80-86225-50-X.

Krüger T., Benke D., Eitner F., Lang A., Wirtz M., Hamilton-Williams E. E., Engel D., Giese B., Müller-Newen G., Floege J., Kurts C.: *Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis*. Journal of the American Society of Nephrology 2004; 15(3):613-21

Lewis K. L., Reizis B.: *Dendritic cell: Arbiters of immunity and immunological tolerance*. Cold Springs Harb Perspectives in Biology 2012; 4(8):a007401

Lin K. W., Jacek T., Jacek R. : *Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity*. Journal of cancer research and therapeutics 2006; 2(2):35-40

Lipscomb M. F., Masten B. J. : *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiological reviews 2002; 82(1):97-130

López-Bravo M., Miquito de la Escalera M., Domínguez P. M., González-Cintado L., del Fresno C., Martín P., Martínez del Hoyo G., Ardavín C. : *IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation*. Journal of allergy and clinical immunology 2013; 132(6):1409-19

Lutz M. B., Kukutsch N., Oglivie A. L. Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. : *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. Journal of immunological methods 1999; 223(1):77-92

Lutz M. B., Rössner S. : *Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum*. Immunobiology 2007; 212(9-10):855-62

Mahnke K., Knop J., Enk A. H. : *Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'*. Trends in Immunology 2003; 24(12):646-51

Menges M., Baumeister T., Rössner S., Stoitzner P., Romani N., Gessner A., Lutz M. B. : *IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity*. Journal of leucocyte biology 2005; 77(4):535-43

Merad M., Sathe P., Helft J., Mortha A. : *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annual Review of Immunology 2013; 31: 563-604

Mikula I. Jr., Pastoreková S., Mukula I. Sr. : *Toll-like receptors in immune response to the viral infections*. Acta Virologica 2010; 54(4):231-45

Montaldo E., Del Zott G., Della Chiesa M., Mingari M. C., Moretta A., De Maria A., Moretta L. : *Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function*. Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology 2013; 83(8):702-13

Muzio M., Mantovani A. : *Toll-like receptors*. Microbes and infection/Institut Pasteur. 2000; 2(3): 251-5

Steinman R. M., Nussenzweig M. C. : *Dendritic Cells: Features and Functions*. Immunological Review 1980; 53: 127-147

Šedivá D., Stříž I., *Dendritické buňky a jejich úloha v imunitních reakcích*. Alergie 2002; 2:133-138

Šterzl J., *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*, Česká imunologická společnost
1993, 480s.,

Šterzl J., *Vývoj a indukce imunitní odpovědi*, nakladatelství Československé akademie věd
1989, 464s., ISBN 21-084-88

Takeda K., Akira S. : *TLR signaling pathways*. Seminars in Immunology 2004; 16:3-9
Tauber, A. I.: *Metchnikoff and the phagocytosis theory*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol 2003; 4:
897–901.

Tew J. G., Wu J., Qin D., Burton G. F., Szakal A. K. : *Follicular dendritic cells and
presentation of antigen and costimulatory signals to B cells*. Immunological reviews
1997; 156:39-52

Van Spriël A. B., de Jong E. C. : *Dendritic cell science: more than 40 years of history*.
Journal of leukocyte biology 2013; 93(1):33-8

Zhan Y., Vega-Ramos J., Carrington E. M., Villadangos J. A., Lew A. M., Xu Y. : *The
inflammatory cytokine, GM-CSF, alters the developmental outcome of murine dendritic
cells*. European Journal of Immunology 2012; 42(11):2889-900