

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

In vitro aktivace imunitních buněk pomocí TLR agonistů

Bakalářská práce

Pavla Jarošková

Školitel: doc. RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2024

Jarošková P., 2024: In vitro aktivace imunitních buněk pomocí TLR agonistů. [Analysis of in vitro activation of inflammation in immune cells by TLR agonists. Bc. Thesis, in Czech] - p 61
Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this work was to stimulate cell lines IC-21 and PMJ2-R cell with selected TLR ligands, namely LPS, LTA, FLAG and POLY(I:C). The sensitivity of each cell line to these stimulatory agents was assessed by using qRT-PCR, ELISA and Flow Cytometry.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 19. 7. 2024

.....

Pavla Jarošková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který této práci obětoval.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Záněť	2
1.1.1	Buňky podílející se na zánětlivé odpovědi	2
1.1.2	Znaky aktivace zánětlivé odpovědi	6
1.1.3	Povrchové znaky aktivace imunitních buněk	8
1.1.4	Průběh zánětlivé reakce	9
1.2	Pattern Recognition Receptors (PRRs).....	10
1.2.1	Aktivace PRRs	10
1.2.2	Typy PRRs	11
1.3	Toll Like Receptory (TLR).....	14
1.3.1	Struktura TLR receptorů	15
1.3.2	Aktivace TLRs	17
2	Cíle práce.....	19
3	Materiál a metody.....	20
3.1	Chemikálie a materiál	20
3.2	Metody.....	22
3.2.1	Kultivace buněčných kultur	22
3.2.2	Aktivace buněčných linií	22
3.2.3	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction	24
3.2.4	Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent assay (sn-ELISA)	26
3.2.5	Průtoková cytometrie	28
4	Výsledky.....	30
4.1	qRT-PCR.....	30
4.1.1	Výběr referenčního genu.....	30
4.1.2	Výsledky qRT-PCR analýzy	32
4.2	Výsledky sn-ELISA.....	36
4.2.1	Koncentrace TNF- α stanovena metodou sn-ELISA.....	37
4.2.2	Koncentrace IL-6 stanovena metodou sn-ELISA.....	38
4.2.3	Koncentrace IL-1 β stanovena metodou sn-ELISA.....	39
4.2.4	Koncentrace cytokinů stanovena metodou sn-ELISA u primárních buněk stimulovaných LPS	40
4.3	Průtoková cytometrie	41
5	Diskuze	42

6	Závěr.....	49
7	Seznam zkrtek.....	50
8	Literatura.....	52

1 Úvod

Imunitní systém savců lze rozdělit na nespecifickou (vrozenou) a specifickou (adaptativní) složku. Tyto dvě části spolupracují na ochraně jedince (Medzhitov 2007). Vrozená imunita je při infekci aktivována rychleji a slouží jako první nespecifická obrana proti patogenům, které vnímá prostřednictvím PRRs (receptory pro rozpoznávání vzorců). Toto označení zahrnuje celou škálu receptorů, které podle jejich struktury dělíme do pěti skupin, a to TLR, NLR, CLR, ALR a RLR, které budou podrobněji popsány dále. Vyznačují se schopností přímo detekovat konzervované mikrobiální struktury (označované jako PAMPs), anebo molekulové struktury spojené s poničením tkáně (DAMPs). To je možné díky extracelulárním doménám, které tento ligand rozpoznají, čímž se spustí kaskáda dějů vedoucí k aktivaci buňky (Li a Wu 2021).

Aktivace buněk nesoucí tyto receptory (makrofágy, dendritické buňky, granulocyty a další) vede k produkci prozánětlivých cytokinů, které je možno laboratorními metodami detekovat a kvantifikovat (Li a Wu 2021). Například stimulace TLR receptorů způsobuje expresi a uvolnění TNF- α , IL-1 β a IL-6, které koordinují následnou lokální i systemickou zánětlivou odpověď (Medzhitov 2007).

Existuje mnoho druhů PAMPs, na které buňka může reagovat s různým způsobem a různou intenzitou. Proto byla v této práci otestována čtveřice TLR ligandů: LPS, LTA, FLAG a POLY(I:C). Byla pozorována reakce buněk na tyto stimuly pomocí metod qRT-PCR, ELISA a průtokové cytometrie.

Efektorové mechanismy nespecifické imunity po aktivaci dále patogen jednak ničí, ale také napomáhají k zahájení adaptativních imunitních procesů, a to zejména prezentací antigenů na povrchu antigen prezentujících buněk (dendritické buňky, makrofágy nebo B-lymfocyty) a produkcí cytokinů (Yumoto et al. 2018; Medzhitov 2007).

Adaptativní imunitní systém aktivuje imunitní odpověď v závislosti na konkrétní hrozbě. To je umožněno specifickými receptory, které navazují vždy konkrétní typ antigenu. V organismu vzniká během vývoje rozsáhlý repertoár těchto receptorů s náhodnou, ale úzkou specifitou, a to díky somatické rekombinaci genových segmentů obsažených v zárodečné linii (Medzhitov 2007). Tyto receptory se vyskytují na T a B lymfocytech jako T-buněčné receptory a protilátky. Aktivace tohoto typu imunity spočívá v klonální expanzi malého množství antigenně specifických lymfocytů. Proces expanze ale trvá delší dobu (vrcholu

dosahuje asi 10 dní po aktivaci), proto jsou pozorované charakteristické znaky zánětu spíše dílem vrozené imunity (Barton 2008; Nicholson 2016).

1.1 Zánět

Zánět je obranná odpověď organismu vyvolaná infekcí či poraněním tkáně (Zhang a Sun 2015). Vyvinul se jako adaptativní mechanismus pro znovunastolení homeostázy. Hlavní funkcí tohoto imunitního procesu je potlačení infekce a zahojení způsobeného poškození organismu (Medzhitov 2008).

Tento proces je energeticky velmi náročný a zahrnuje poničení tkáně organismu. Ideálně má tedy zánětlivá reakce rychlý průběh a zároveň je co nejvíce specifická vůči konkrétnímu stimulu (Zhang a Sun 2015).

Jedná se o vícestupňový proces zprostředkovaný mnoha mediátory, které regulují specifické aspekty zánětlivé odpovědi (Fioranelli et al. 2021). Přestože se jedná o fyziologický, pro život nutný, mechanismus, deregulovaná reakce může vést k excesivním a dlouhodobým změnám tkáně, což může způsobit chronický zánět, orgánové selhání či sepsi (Barton 2008; Zhang a Sun 2015).

1.1.1 Buňky podílející se na zánětlivé odpovědi

Buňky nespecifického imunitního systému exprimují invariantní receptory rozpoznávající signály mikrobiální infekce, či detekují poranění v organismu. Především se jedná o fagocytující buňky, jako makrofágy, neutrofilů a dendritické buňky, ale třeba i žírné buňky, NK buňky, fibroblasty, epitelové buňky a endotelové buňky (Barton 2008; Wynn a Vannella 2016).

1.1.1.1 Makrofágy

Mezi klíčové buňky podílející se na obnově a regeneraci tkání patří monocyty a tkáňové makrofágy. Mají různé funkce, jako je prezentace antigenů, fagocytóza mrtvých buněk a produkce cytokinů a chemokinů (Mohammadi et al. 2019). Poruchy regulace makrofágů a jejich cytokinů vedou k nekontrolované produkci prozánětlivých molekul a růstových faktorů, což má za následek poškození tkáně a rozvoj patologické fibrózy (Wynn a Vannella 2016).

Makrofágy se vyvíjejí během embryogeneze z erytro-myeloidních progenitorů žloutkového váčku (EMP), které dávají za vznik pre-makrofágům. Ty poté kolonizují vyvíjející se orgány, kde se diferencují do tkáňově specifických makrofágů (Mass et al. 2023). Mezi ně můžeme řadit kostní osteoklasty, mikrogliové buňky z centrální nervové soustavy, Kupfferovy buňky jater a mnoho dalších (Mosser a Edwards 2008).

V postnatálním období se monocyty diferencují ze společného myeloidního progenitoru v kostní dřeni. Tyto buňky dávají vzniknout i dalším typům buněk, jako jsou granulocyty, žírné buňky a dendritické buňky. Postupně z této buňky vznikají monoblasty, pro-monocyty a nakonec zralé monocyty, které jsou uvolňovány do krevního oběhu. Monocyty migrují z krve do tkání, kde doplňují populace tkáňových makrofágů. Tím je udržována homeostáza organismu při boji proti infekci (Mass et al. 2023; Mosser a Edwards 2008).

Přestože existuje mnoho různých fenotypů makrofágů, obecně se dá říci, že se dělí do dvou subpopulací, které jsou ovlivněny polarizací T-buněk na T_H1 a T_H2 – M1 a M2 makrofágy. Tyto dvě skupiny se liší způsobem jejich aktivace. Zatímco makrofágy M1 jsou aktivovány takzvaně klasicky, M2 makrofágy jsou aktivovány alternativně. Cytokiny produkované T_H1 v reakci na mikrobiální podněty (především $IFN-\gamma$) polarizují makrofágy na fenotyp M1. Fenotyp M2 je naopak stimulován cytokiny IL-4 a IL-13, které jsou produkované T_H2 lymfocyty (Biswas et al. 2012).

Při infekci patogenem jsou nejdříve přítomny zejména makrofágy typu M1. Produkují prozánětlivé molekuly, jako je $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-12 a IL-23, což napomáhá rekrutaci dalších imunitních buněk, ničení patogenů a aktivaci adaptivní imunity (Biswas et al. 2012; Mohammadi et al. 2019).

Po eliminaci hrozby následuje ukončení zánětu, k čemuž přispívají makrofágy M2. Přítomnost apoptotických buněk, imunitních komplexů a IL-10 indukují polarizaci makrofágů na M2 fenotyp. Ty exprimují protizánětlivé faktory, například IL-10, $TGF\beta$ a lipidové mediátory, které tlumí probíhající zánětlivou reakci. Dochází k remodelaci tkáně a k návratu homeostázy (Biswas et al. 2012). M2 makrofágy ale hrají roli nejen při remodelaci tkání při zánětu, ale i při fyziologických procesech, například při vývoji mléčné žlázy a organogenezi ledvin, či pankreatu (Pollard 2009).

1.1.1.2 Granulocyty

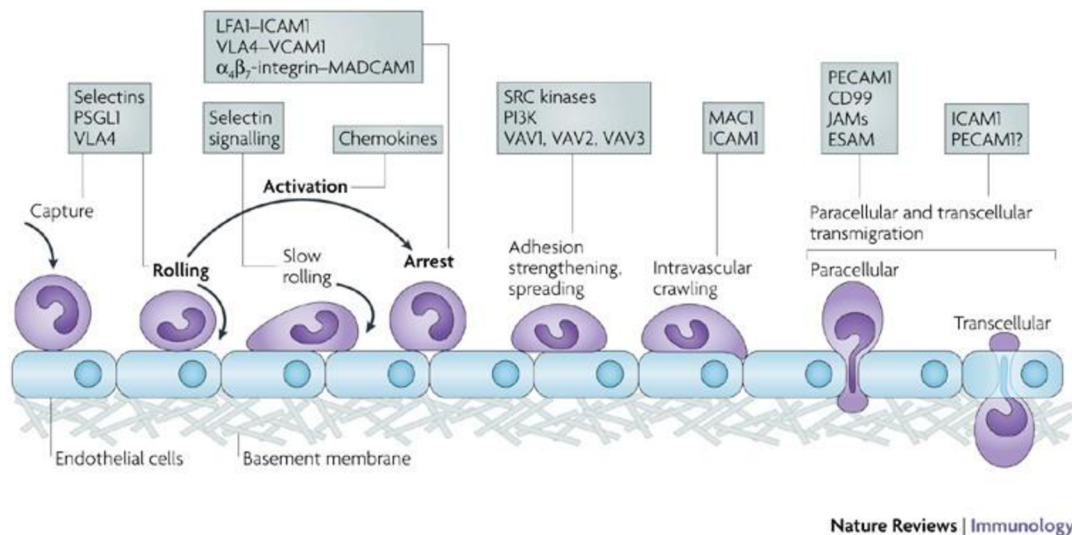
Granulocyty obsahují specifická cytoplazmatická granula. Rozlišují se tři hlavní skupiny granulocytů, a to neutrofilů, bazofilů a eosinofilů. Toto rozdělení je podmíněno obsahem granul, které ovlivňuje, jak se jednotlivá granula barví (Siemińska et al. 2021).

Zralé eosinofily se uvolňují do krve z kostní dřeně vlivem zánětlivých podnětů jako GM-CSF (granulocyto–makrofágový kolonie stimulující faktor). Jsou schopné aktivace a rekrutace do tkání, pokud jsou přítomny vhodné podněty, především eotaxiny a IL-5 (Rosenberg et al. 2013).

Bazofily jsou nejméně početné granulocyty v krvi. V případě potřeby migrují do tkání. Jejich granula obsahují heparin, histamin a další mediátory. Hrají roli v různých imunitních reakcích, zejména v těch alergických a proti-parazitárních (Miyake a Karasuyama 2017; Siemińska et al. 2021).

Nejhojněji zastoupenými granulocyty v periferní krvi jsou neutrofilů. Mají řadu efektorových mechanismů, jimiž ničí patogen. Ty zahrnují zejména fagocytózu, degranulaci a tvorbu extracelulárních pastí (NETs). Jejich repertoár funkcí je ovšem mnohem širší. Neutrofilů mají schopnost reagovat na velké množství signálů a odpovídat produkcí několika cytokinů a dalších molekul, které regulují zánětlivou odpověď organismu (Rosales 2018).

Z krve mohou být neutrofilů mobilizovány do místa infekce nebo zánětu procesem leukocytární adhezni kaskády. Extravasace leukocytů zahrnuje několik kroků. Původní tři kroky – kroužení, adheze a transmigrace – byly později doplněny o zpomalené kroužení, posilování adheze, plazení, paracelulární a transcelulární migraci a migraci skrz bazální membránu. Endotelové buňky v blízkosti místa infekce exprimují adhezivní selektiny. Ty mají funkci receptorů pro glykoproteinové ligandy exprimované neutrofilů, jako například molekula PSGL1. Jejich interakce způsobuje první navázání a valení neutrofilů po endotelu. Neutrofil je následně aktivován chemokiny, které zvyšují afinitu leukocytárních $\beta 2$ integrinů. $\beta 2$ integriny se navazují na adhezivní molekuly, z nichž nejvýznamnějšími jsou ICAM molekuly na buňkách endotelu. To způsobuje pevnou adhezi neutrofilu a umožňuje další krok, transmigraci (Chavakis et al. 2009; Ley et al. 2007).



Obr. 1: Leukocytová adhezni kaskáda (převzato z Ley et al. 2007)

Neutrofilů pak migrují do místa infekce a fagocytují patogeny. Ty jsou poté rozloženy pomocí látek obsažených v granulích, jako je elastáza, katepsin G a proteináza 3. V případě, že se v tkáni TNF- α vyskytuje bez přítomnosti mikroba, neutrofil uvolňuje obsah těchto granulí do extracelulárního prostoru a vytváří tak nehostinné prostředí zabráňující šíření potencionálních infekce. Další možností obrany organismu je tvorba NETs. Jde o vláknité síť vytvořené jadernými a granulárními komponenty neutrofilu, především histony, chromatinem a globulárními proteiny. Tato struktura imobilizuje patogen a později se podílí na jeho likvidaci. Neutrofilů nevyhnutelně podléhají apoptóze a jsou odklizeny makrofágy (Barton 2008; Lee et al. 2017).

1.1.1.3 Dendritické buňky

Hlavní funkcí dendritických buněk (DC) je prezentace antigenů T-buňkám. Kromě toho také vylučují cytokiny a růstové faktory, které jsou důležité pro aktivaci a diferenciaci T-buněk. Dendritické buňky jsou tedy klíčové pro propojení vrozené a adaptivní imunity. Nacházejí se prakticky ve všech tkáních. Nalézt je můžeme ve stavu zralém či nezralém, přičemž prezentace antigenů jsou schopné pouze zralé DC. Zrání je spuštěno narušením tkáňové homeostázy, ať už poškozením nebo infekcí. Během zrání DC dochází k reorganizaci jejich cytoskeletu, což vede ke zvýšení jejich pohyblivosti. Současně se zvyšuje i exprese MHC II a kostimulačních molekul. Buňky zároveň začínají produkovat prozánětlivé cytokiny (Patente et al. 2019).

1.1.2 Znaky aktivace zánětlivé odpovědi

Makroskopické projevy zánětu jako první popsal Aulus Cornelius Celsus (30 BC–38 AD), který definoval jeho čtyři kardiální znaky: *dolor* (bolest), *calor* (zteplání), *rubor* (začervenání), *tumor* (otok). K nim byl později přidán znak pátý, *functio laesa* (omezení funkce) (Tracy 2006).

Existuje mnoho biomarkerů, podle nichž lze rozpoznat zánět na mikroskopické úrovni. Pro jejich použitelnost v klinickém laboratorním prostředí je podstatné, aby byly stabilní a získatelné neinvazivními metodami. Zároveň by mělo být možné je stanovit co nejrychleji a nejefektivněji, ale tak, aby výsledky byly stále validní (Menzel et al. 2021).

Intracelulární mediátory, jako je nuclear factor-kappa B (NF- κ B), Nukleární faktor aktivovaných T buněk (NFAT) a aktivátor protein 1 (AP-1), mohou být považovány za nitrobuněčné biomarkery, ale pro obtížnost jejich kvantifikace nejsou běžně používány pro detekci zánětu (Roe 2021).

Mezi častější biomarkery zánětu patří oxidační stres (OS), ačkoliv ten může být jak příčinou, tak důsledkem zánětu. Nízká úroveň OS je fyziologická, z klinického pohledu jsou podstatné spíše chronicky zvýšené hodnoty. Klinicky nejčastěji sledované znaky zánětu jsou reaktanty akutní fáze, především C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A a haptoglobin. Typicky se tvoří na počátku zánětu a jsou vylučovány játry (Menzel et al. 2021).

Mezi další běžně sledované faktory patří prozánětlivé cytokiny. Spadají mezi ně chemokiny, interleukiny, interferony, lymfokiny, adipokiny a tumor nekrotizující faktory. Hlavními uvolňovanými cytokiny v reakci na infekci patogeny jsou interferony, dále pak tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a interleukiny jako IL-1 β , IL-6, IL-8 a jejich receptory, které jsou vylučovány z různých buněk po stimulaci endotoxiny, jako je LPS (lipopolysacharid). Ty mohou být produkovány imunitními buňkami, například makrofágy, monocyty, lymfocyty, neutrofilů, žírné buňky a endotelové a epiteliální buňky (Menzel et al. 2021).

Tumor nekrotizující faktor alfa byl pojmenován na základě své cytotoxické aktivity vůči nádorovým buňkám (Carswell et al. 1975). Kromě té má TNF- α mnoho funkcí při udržení homeostázy, či v patogenezi (Kalliolias a Ivashkiv 2016). Všichni členové ligandové rodiny TNF jsou exprimovány jako transmembránové proteiny typu II (Kany et al. 2019). Transmembránová forma může být za pomoci TNF- α -konvertujícího enzymu (TACE)

proteolyticky štěpena, čímž je uvolněn rozpustný TNF- α (Kalliolias a Ivashkiv 2016). Tato forma má zvýšenou biologickou aktivitu. Hlavním zdrojem TNF- α jsou makrofágy a T-buňky, ale i B-buňky, neutrofilové buňky a endotelové buňky. TNF- α se váže na transmembránové receptory typu I, a to konkrétně na TNF receptor I (TNFR-I) a TNF receptor II (TNFR-II). TNFR-I je exprimován na všech buňkách kromě erytrocytů a TNFR-II se nachází pouze na endoteliálních a imunitních buňkách. TNFR-II může být aktivován i transmembránovým TNF (Kany et al. 2019).

Interleukin-1 (IL-1) je ústředním mediátorem vrozené imunity a zánětu. Rodina IL-1 zahrnuje 7 ligandů s agonistickou aktivitou (IL-1 α a β , IL-18, IL-33, IL-36 α , β , γ), tři antagonisty receptorů (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) a protizánětlivý cytokin (IL-37). Přestože jsou IL-1 α a IL-1 β kódovány různými geny, mohou se vázat na stejný receptor (Kany et al. 2019). Prekurzor IL-1 α se nachází v intracelulárním prostoru a v mnoha typech buněk včetně hepatocytů, nefrotického epitelu, endotelu a epiteliálních buněk gastro-digestivního traktu (Netea et al. 2015). Primárními zdroji IL-1 β jsou po jejich aktivaci imunitní buňky, jako jsou monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Tyto cytokiny jsou syntetizovány ve formě neaktivních prekurzorů, které musí být aktivovány štěpením prozánětlivými kaspázami (Medzhitov 2007). Všechny buňky vrozeného imunitního systému exprimují nebo jsou ovlivněny členy rodiny IL-1. Je hlavním patogenním mediátorem zánětlivých, autoimunitních, infekčních a degenerativních onemocnění. (Garlanda et al. 2013).

Rodina cytokinů interleukinů (IL)-6 je skupina cytokinů, kterou tvoří IL-6, IL-11, CNTF (ciliární neurotrofický faktor), LIF (leukemický inhibiční faktor), OSM (onkostatin), CT-1 (kardiotrofin 1), CLC (kardiotrofinu podobný cytokin) a IL-27 (Rose-John 2018). Je vylučován T-buňkami, monocyty, makrofágy, endotelovými buňkami a fibroblasty. Podílí se na reakci akutní fáze, zrání B lymfocytů a diferenciaci makrofágů (Kany et al. 2019). Zároveň podporuje diferenciaci T_H buněk (T helper) na subpopulaci T_H2 a současně inhibuje polarizaci T_H1 pomocí dvou molekulárních mechanismů. IL-6 aktivuje transkripci zprostředkovanou transkripčním faktorem NFAT, což vede k produkci IL-4 T_H buňkami a jejich diferenciaci na T_H2. Zároveň IL-6 zvyšuje expresi supresoru cytokinové signalizace (SOCS)-1, čímž negativně ovlivňuje expresi interferonu γ a tím i diferenciaci buněk na T_H1 (Diehl a Rincón 2002).

Sledováním biomarkerů lze dlouhodobě pozorovat progres, či funkčnost léčby zánětu (Prasad et al. 2016).

1.1.3 Povrchové znaky aktivace imunitních buněk

Na povrchu buněk je možné detekovat značné množství povrchových znaků. U některých z nich je možné pozorovat změnu jejich exprese při aktivaci (Duan et al. 2016).

Pomocí průtokové cytometrie lze zjistit různé povrchové markery imunitních buněk, které mohou být klíčové při detekci například zánětu, ale i jiných onemocnění. Příkladem může být CD38, který je exprimován na povrchu buněk periferní krve u pacientů s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií, a je využíván jako důležitý prognostický faktor pro vývoj nemoci (Ibrahim et al. 2001).

Při pozorování odpovědi na exogenní stimul, jako je například LPS, je možné na imunitních buňkách, hlavně na těch antigen prezentujících (například na dendritických buňkách, makrofázích a neutrofilech), ale i na B a T buňkách, pozorovat zvýšenou expresi povrchových molekul, jako jsou CD40, CD80, CD86, CD95 a MHC třídy II ve srovnání s kontrolními, neaktivovanými skupinami (Taddio et al. 2021; Nolte et al. 2007).

Zvýšená exprese molekul CD80, CD86 a MHC třídy II charakterizuje aktivovanou buňku. Důvodem zvýšené exprese těchto znaků je jejich důležitá role při antigenní prezentaci T-lymfocytům (Saito et al. 2020).

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy I a třídy II hraje klíčovou roli díky své schopnosti navázat a prezentovat peptidový antigen CD8+, respektive CD4+ T-buňkám. MHC I primárně prezentuje endogenní antigeny, zatímco MHC II antigeny exogenní. Molekuly MHC II. třídy, zásadní pro zahájení antigenně specifické imunitní odpovědi (Holling et al. 2004), jsou konstitutivně exprimovány skupinou specializovaných buněk, které označujeme jako profesionální APC (antigen prezentující buňky). Mezi ně můžeme zařadit monocyty, makrofágy, dendritické buňky a B-lymfocyty. Některé buňky epiteliálních tkání, fibroblastů a keratinocytů jsou schopné, za přítomnosti prozánětlivých cytokinů, indukovat expresi MHC II molekuly, i když nepatří mezi profesionální APC (Holling et al. 2004).

Molekuly CD80 a CD86, dříve souhrnně označované jako B7, se vyskytují na APC buňkách. Jde o ligandy povrchových molekul CD28 a CTLA-4. CTLA-4 a CD28 jsou strukturně příbuzné molekuly, které se vyskytují především na povrchu T-lymfocytů (van der Merwe et al. 1997). Navázání CD28 a CD80 nebo CD86 napomáhá přenosu aktivačních signálů a tím i aktivaci T-buněk. Inhibice této interakce blokuje imunitní odpověď. CTLA-4

je exprimován T-buňkami až po aktivaci a váže se na CD80 a CD86 s vyšší afinitou než CD28 (Linsley a Ledbetter 1993). Má spíše inhibiční funkci, a proto hraje roli při potlačení nadměrné expanze již aktivovaných T buněk (Kearney et al. 1995).

1.1.4 Průběh zánětlivé reakce

Zánětlivá reakce se dělí na čtyři fáze: rozpoznání infekce, rekrutace buněk do místa infekce, eliminace mikrobů a odeznění zánětu spojené s návratem k homeostázi. Tato reakce vrozené imunity probíhá současně s aktivací imunity adaptativní, a to prezentací antigenů APC buňkami naivním lymfocytům. Je zde patrná spolupráce obou typů imunity při aktivaci lymfocytů (Barton 2008).

Na rozpoznání infekce se podílí vícero typů buněk. Tyto buňky exprimují PRR receptory, které jsou schopné rozpoznat infekci či poranění. Nejvýznamnější buňky v raném stádiu infekce jsou makrofágy a dendritické buňky sídlící ve tkáních (Brannon et al. 2022). Konečným výsledkem rozpoznání patogenu je aktivace fagocytů a žírných buněk spojená s uvolněním prozánětlivých cytokinů a připravených mediátorů, jako například TNF, IL-1 β a IL-6. Uvolněné cytokiny zahajují kaskádu událostí vedoucí k aktivaci lokálního endotelu, vazodilataci a zvýšení propustnosti cév. To umožňuje migraci leukocytů a sérových proteinů do místa infekce (Barton 2008; Medzhitov 2007).

Během několika hodin po rozpoznání infekce dochází k rekrutaci neutrofilů a monocytů do místa zánětu. Dochází k agresivnímu ničení patogenů. Vedlejším účinkem této obranné reakce je produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, které poškozují okolní tkáň (Pradeep Kumar et al. 2018).

Po úspěšném zadržení infekce se uvolňují protizánětlivé signály. Cílem je zastavení zánětu a oprava postiženého místa. Hrají zde roli mediátory odvozené od lipidů, zejména lipoxiny, protektiny a resolvinu. Lipoxiny zastavují příliv neutrofilů, ale podporují rekrutaci monocytů. Napomáhají vychytávání apoptotických buněk makrofágy a odstraňování odumřelých buněk a tkáňových zbytků. Makrofágy, neutrofilové a epitelové buňky spouští produkci SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) a IL10 and TGF- β . To vede k útlumu zánětu a hojení (Barton 2008; Ortega-Gómez et al. 2013).

1.1.4.1 Chronický zánět

Na rozdíl od akutního zánětu, který je častou reakcí na exogenní patogeny, je chronický zánět způsoben spíše endogenními ligandy uvolněnými poškozením tkáně. Chronický zánět je charakteristický dlouhodobým uvolňováním prozánětlivých cytokinů. Dlouhodobý zánět může vést k nenávratnému poškození tkání, fibrogenezi a rozvoji mnoha onemocnění. Mírný chronický zánět je spojen s autoimunitními, neurologickými nebo kardiovaskulárními onemocněními, s rakovinou či metabolickým syndromem (Suzuki 2019; Liu et al. 2017).

Mezi rizikové faktory pro vznik chronického zánětu a s ním spojených onemocnění patří špatný životní styl, genové a epigenetické mutace, nerovnováha mezi protizánětlivými a prozánětlivými cytokiny, aktivované makrofágy a hromadění přestárých buněk (Liu et al. 2017).

1.2 Pattern Recognition Receptors (PRRs)

1.2.1 Aktivace PRRs

Pro aktivaci nespecifické imunitní odpovědi je nutné, aby příslušné imunitní buňky byly schopné rozeznat antigen a adekvátně na něj zareagovat. Dlouhou dobu se věřilo, že imunologická odpověď vrozené části imunitního systému je zcela nespecifická, protože na rozdíl od buněk adaptivní imunity nemají antigeny specifické receptory. Tato domněnka byla překonána prací imunologa Janewaye Jr., který přišel s konceptem tzv. receptorů rozpoznávajících vzorce (PRRs). (Li a Wu 2021; Janeway et al. 2001).

Ačkoliv je známo více druhů typů PRRs, můžeme identifikovat několik jejich společných charakteristik. Tyto receptory jsou kódovány zárodečnou DNA buňky. Jsou neklonální, díky čemuž jsou buňky daného typu, co se specifity týče, identické. Detekce patogenu je zároveň nezávislá na buněčném životním cyklu a imunologické paměti (Akira et al. 2006). Jak bylo již zmíněno, primárními původci zánětu jsou mikrobiální infekce a poškození tkáně. Přestože jsou tyto stimuly odlišné, organismus na ně reaguje podobným způsobem (Brannon et al. 2022).

PRRs rozpoznávají mikrobiální molekuly, známé jako molekulární vzory asociované s patogeny (PAMPs). Tyto molekuly jsou esenciální pro ochranu mikrobiálního organismu, a proto je pro patogeny obtížné je modifikovat (Akira et al. 2006). Hlavními PAMPs jsou mikrobiální nukleové kyseliny, včetně DNA (např. nemetylované CpG motivy),

dvouvláknová RNA (dsRNA), jednovláknová RNA (ssRNA) a 5'-trifosfátová RNA, lipoproteiny, povrchové glykoproteiny a membránové komponenty jako peptidoglykany, kyselina lipoteichoová, lipopolysacharid (LPS) a glykosylfosfatidylinositol (Spanou et al. 2017).

U sterilního poranění, na rozdíl od toho s přidruženou infekcí, nedojde k porušení fyzické bariéry a nedochází proto k zanesení mikrobů do rány (Barton 2008). Je zachováno například při ischemii, ischemicko-reperfuzních poraněních a traumatu. Ačkoli není takovéto zranění doprovázeno infekcí, vyvolává mnoho dějů s ní spojených, jako je aktivace DC či infiltrace neutrofilů a monocytů (Gallucci et al. 1999; Chen et al. 2007). To je umožněno uvolňováním endogenních látek z poškozených tkání, které označujeme jako molekulární vzorce asociované s poškozením (DAMPs) (Zindel a Kubes 2020). Existuje řada endogenních molekul spojených s nekrotickým odumíráním buněk. Patří mezi ně například proteiny tepelného šoku, β -defensin, hyaluronan, krystaly kyseliny močové a další biomolekuly. Roli TLR v aktivaci zánětu je u sterilního poranění obtížné studovat, protože i v laboratorních podmínkách existuje vysoká šance mikrobiální infekce, která může zkreslit výsledky (Barton 2008).

1.2.2 Typy PRRs

V současné době je identifikováno pět hlavních skupin PRR receptorů na základě jejich proteinové homologie, a to CLR (C-type lectin receptors), RLR (RIG-1 like receptors), NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), ALR (AIM2-Like Receptors) a TLR (Toll Like Receptors) (Brubaker et al. 2015). Receptory se liší jak svou lokalizací, tak i typy ligandů, které detekují. V reakci na navázání ligandu na receptor se spouští kaskáda dějů, které vedou ke vzniku transkripčních faktorů a expresi prozánětlivých mediátorů (Takeuchi a Akira 2010).

Tab 1: PRRs a příklady jejich ligandů

Upraveno podle Takeuchi a Akira 2010, Ali Imani Fooladi et al. 2011 a Brubaker et al. 2015)

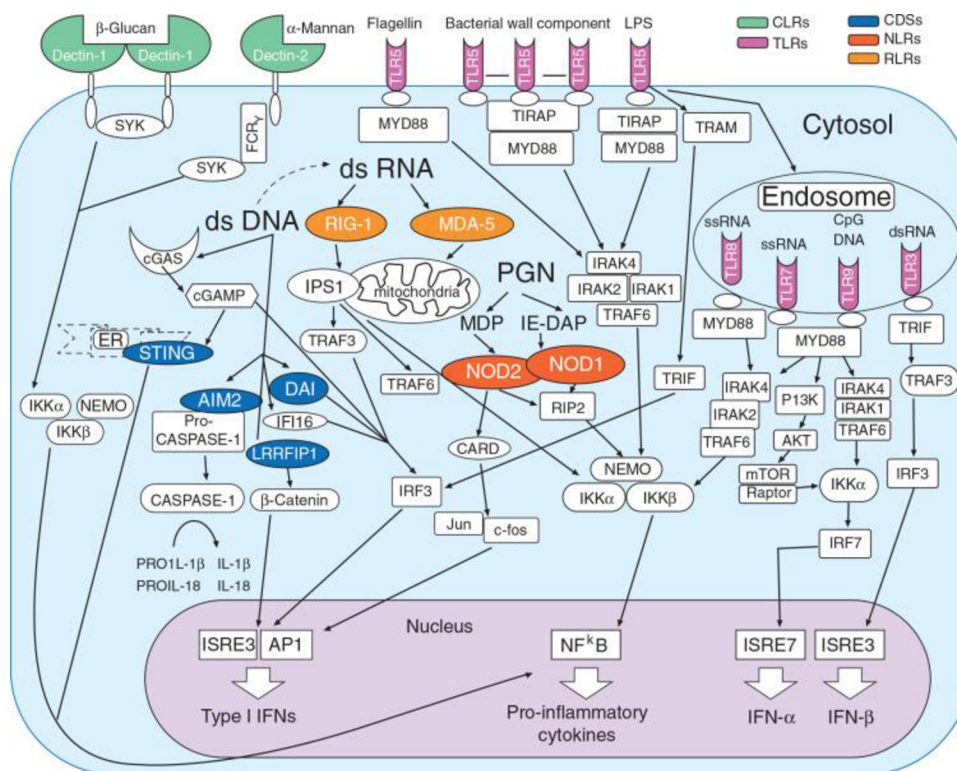
PRRs	UMÍSTNĚNÍ	LIGAND	PŮVODCE
TLR			
TLR 1	Plazmatická membrána	Triacyl lipoprotein	Bakterie
TLR 2	Plazmatická membrána	Lipoprotein	Bakterie, virus, parazit
TLR 3	Endolyzozom	dsRNA	Virus
TLR 4	Plazmatická membrána	LPS	Bakterie, virus
TLR 5	Plazmatická membrána	Flagelin	Bakterie
TLR6	Plazmatická membrána	Diacyl lipoprotein, zymosan, LTA	Bakterie, virus
TLR 7 (lidský TLR 8)	Endolyzozom	ssRNA,	Bakterie, virus
TLR 9	Endolyzozom	Nemetylovaná CpG DNA	Bakterie, virus, protozoa
TLR 10	Endolyzozom	Neznámý	Neznámý
TLR 11	Plazmatická membrána	Profilin-like molekula	Protozoa
RLR			
RIG-I	Cytoplazma	Krátká dsRNA	RNA a DNA virus
MDA5	Cytoplazma	Dlouhá dsRNA	RNA virus (Picomaviridae)
LGP2	Cytoplazma	Neznámý	RNA virus
NLR			
NOD1	Cytoplazma	iE-DAP	Bakterie
NOD2	Cytoplazma	MDP	Bakterie
CLR			
Dectin-1	Plazmatická membrána	β -Glucan	Fungi
Dectin – 2	Plazmatická membrána	β -Glucan	Fungi
MINCLE	Plazmatická membrána	SAP130	Fungi
ALR			
AIM2	Plazmatická membrána, jádro	DNA	Virus
IFI16	Plazmatická membrána, jádro	DNA	Virus

Rodina NLR receptorů se nachází v cytoplazmě. Skládají se ze tří domén, N-koncové regulační domény, nukleotid vazebné domény (NACHT) a C-koncové domény bohaté na leucin (LRR). Kromě N-koncové domény je složení NLRs konzervativní. LRR doména rozpoznává PAMPs a DAMPs a váže se s nimi, čímž aktivuje doménu NACHT. Doména NACHT přenáší signál do N-koncové domény, načež se spouští kaskáda dějů, které mají za následek produkci prozánětlivých mediátorů (Zhou et al. 2023).

Transmembránové proteiny CLRy obsahují jednu nebo více domén vázajících sacharidy na mikroorganismech. Tyto domény určují sacharidovou specifičnost receptoru. CLRy se na regulaci prozánětlivé reakce se podílí buď přímou indukcí genové exprese prozánětlivých cytokinů, nebo modulací TLR signalizace. Uplatňují se zejména při detekci a obraně proti houbovým onemocněním (Takeuchi a Akira 2010; Geijtenbeek a Gringhuis 2009).

RLRs jsou cytoplazmatické receptory skládající se ze dvou N-koncových domén, centrální helikázové domény a C-koncové regulační domény. Rozpoznávají genomickou RNA a dsRNA virů. Jejich exprese je výrazně zvýšena jako odpověď u buněk, které jsou stimulovány IFN typu I, nebo za přítomnosti virové infekce (Takeuchi a Akira 2010).

ALRS detekují zejména intracelulární DNA. Obsahují doménu PYHIN, která umožňuje interakci protein-protein, a doménu HIN-200, která se váže na DNA. Jejich aktivace vede k tvorbě inflamazomů, které podporují tvorbu prozánětlivých cytokinů a IFN a indukují formu buněčné smrti označované jako pyroptóza (Brubaker et al. 2015).



Obr. 2: Typy PRR a jejich aktivační dráhy (převzato z Shekarian et al. 2017)

1.3 Toll Like Receptory (TLR)

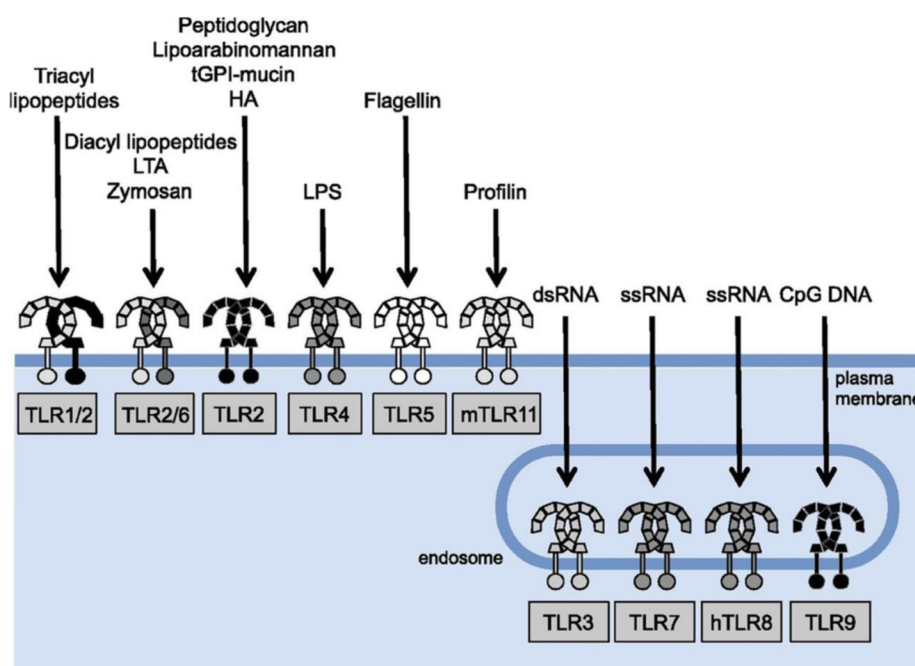
Toll byl původně identifikován jako gen, který hraje významnou roli v embryogenezi při formaci dorzoventrální osy u drozofily. O deset let později byla objevena jeho role v protiplísňové imunitě a zanedlouho byl nalezen homolog i u savců, který byl nazván Toll Like Receptor neboli receptor podobný Toll (Duan et al. 2022).

Dosud bylo identifikováno 222 TLR u bezobratlých a 28 TLR u obratlovců. U savců bylo nalezeno celkem 13 TLR receptorů, přičemž receptor 11,12 a 13 se vyskytuje pouze u myši (Ali Imani Fooladi et al. 2011; Sameer a Nissar 2021). TLR jsou exprimovány na imunitních buňkách, jako jsou neutrofilové, bazofilové, eozinofilové a lymfocyty, ale i na epitelových a endotelových buňkách, fibroblastech a na buňkách hladkého svalstva (Brubaker et al. 2015).

Receptory vrozené imunity TLR mohou být rozděleny do dvou odlišných subpopulací s ohledem na jejich ligandovou specifitu a distribuci, a to na povrchové a intracelulární. Mezi povrchové TLR řadíme TLR1, 2, 4, 5, 6 a 10. TLR3, 7, 8 a 9 se vyskytují na buněčných

membránách endoplazmatického retikula, endozomů a lyzozomů. Receptory vyskytující se na povrchu buněčné membrány rozpoznávají mikrobiální membránové lipidy a zároveň detekují endogenní ligandy uvolněné z poškozených tkání nebo nekrotických buněk. Intracelulární receptory rozpoznávají především mikrobiální nukleové kyseliny (Miyake 2007; Sameer a Nissar 2021).

Později byly v tělních tekutinách, jako je krev, sliny, plazma a mozkomíšni mok, detekovány rozpustné TLR formy (sTLR). Tyto receptory interferují s aktivací signálních drah povrchových TLR, a tím snižují prozánětlivou aktivaci buněk (Behzadi et al. 2021).



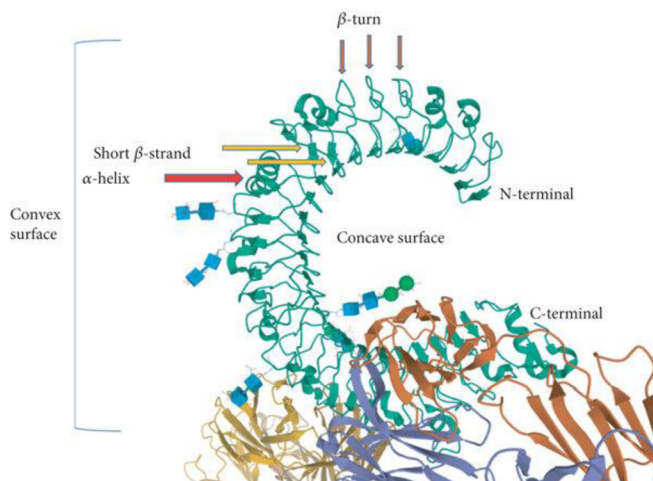
Obr. 3: Extracelulární a intracelulární TLR receptory s jejich ligandy (převzato z (El-Zayat et al. 2019))

1.3.1 Struktura TLR receptorů

TLR řadíme mezi integrální transmembránové proteiny typu I. Obvykle se skládají ze tří domén: N-koncové domény (NTD), střední transmembránové domény a C-koncové domény (CTD).

N-koncová doména, neboli ektodoména, je extracelulární struktura, rozpoznávající a navazující příslušný ligand. Má formu zakřivené solenoidové struktury obsahující 19-25 tandemových repetic bohatých na leucin (LRR). Každá repetice obsahuje 24-29 aminokyselin v konzervovaném motivu xLxxLxLxx (Sameer a Nissar 2021).

Skládá se ze čtyř částí: konvexní plocha, konkávní plocha a vzestupné a sestupné smyčky. Konvexní plocha tvoří variabilní část domény a je složena z několika sekundárních struktur jako α helixy, β -turns a smyčkové struktury. Naproti tomu konkávní plocha je vysoce konzervovaná část ektodomény, a je tvořena krátkými β -řetězci skládajícími se v paralelní β -sheet konfiguraci.



Obr. 4: Struktura ektodomény TLR receptoru, (převzato z Behzadi et al. 2021)

Střední transmembránová doména má formu jediného α -helixu a napojuje se na intracelulární doménu. CTD interaguje s různými adaptorovými molekulami a spouští signální dráhu prostřednictvím své homologní domény toll-IL-1 receptoru (TIR)(Manavalan et al. 2011; Gay et al. 2006; Sameer a Nissar 2021; Behzadi et al. 2021).

TIR doména obsahuje tři motivy, a to box1, box 2 a box 3. Boxy 1 a 3, jsou konzervované sekvence, které jsou společné pro TIR doménu IL-1 receptoru i TLR receptoru. Box 2 se ale u těchto dvou receptorů liší (Behzadi et al. 2021).

Struktura domény je tvořena pěti paralelními β -sheet vlákny, která jsou uzavřena pěti α -helixy. Na ně se váže 8 smyček, které jsou pojmenované podle vláken, které spojují. Například smyčka BB, která spojuje vlákno β B (druhé vlákno β) se šroubovicí α B (druhou šroubovicí α), hraje důležitou roli při interakci dvou TIR domén. TIR doména je pro každý typ TLR receptoru specifická, ale vykazuje velkou podobnost. Například u TLR 1 a TLR6 byla zaznamenána podobnost až 87 % (Behzadi et al. 2021).

1.3.2 Aktivace TLRs

Struktura a ligandová specifita jednotlivých typů TLR receptorů se liší, nicméně sdílejí mnoho společných rysů při jejich aktivaci. Většina známých TLR receptorů využívá konvexní povrch LRR domény k vazbě ligandů, výjimkou je TLR4, který navazuje LPS prostřednictvím MD2 molekuly na konkávním povrchu (Botos et al. 2011).

Vazba ligandu na TLR receptor zprostředkovává dimerizaci ektodomén, což je proces, kdy se dva TLR receptory spojí do páru. Tvorba homo – či hetero – dimeru mění prostorovou orientaci cytoplazmatických domén TIR, což umožňuje jejich aktivaci, a tím i iniciaci signální kaskády vedoucí k imunitní odpovědi. Vlastní signalizační kaskáda závisí na typu ligandu, interagujícím TLR a adaptorové molekule zapojené do signalizační dráhy (Sameer a Nissar 2021; Botos et al. 2011).

Adaptorové molekuly jsou charakteristické přítomností TIR domény v jejich struktuře. Jsou rekrutovány k dimerizovanému TLR receptoru a předávají informaci dál do buňky.

Řadíme mezi ně:

- i. myeloidní diferenciační protein primární odpovědi 88 (MyD88)
- ii. Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)
- iii. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)
- iv. TRIF-related adapter molecule (TRAM)
- v. B-cell adaptor for phosphoinositide (BCAP)
- vi. Sterilní protein obsahující α -a armadillo-motiv (SARM)

Signalizaci jako takovou dělíme na dvě odlišné dráhy podle účastníků se adaptorových molekul, a to MYD88-dependentní a TRIF-dependentní (Sameer a Nissar 2021). Dimerizované receptorové domény TIR jsou rozpoznávány dvěma membránovými adaptorovými proteiny: adaptorovým proteinem TIRAP a TRAM. Na tyto struktury se následně navazují adaptorové molekuly MyD88 respektive TRIF (Duan et al. 2022).

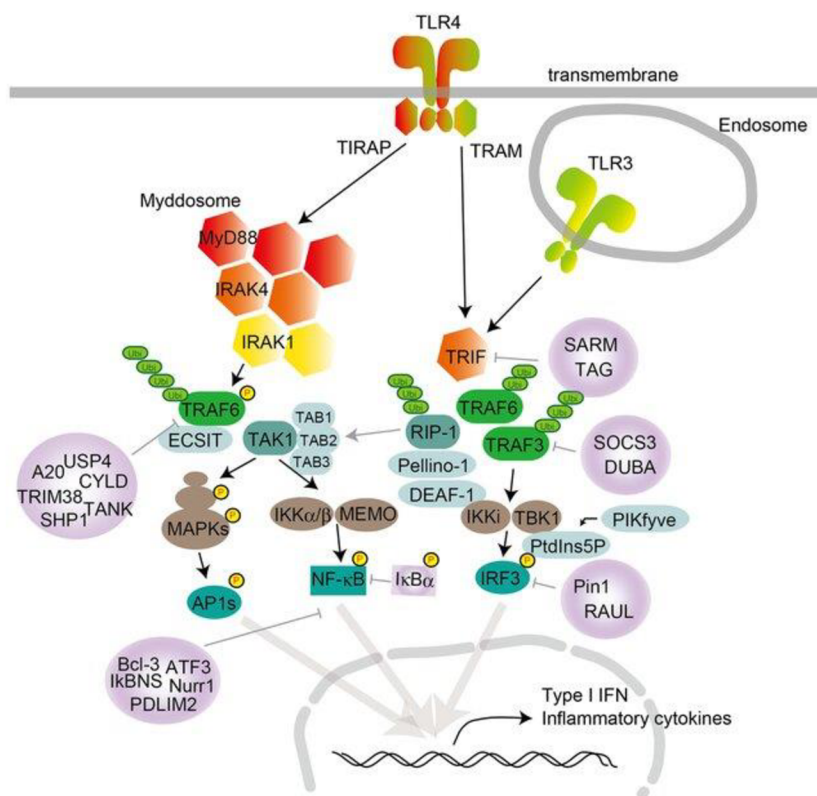
1.3.2.1 Dráha dependentní na MYD88

Jedná se o dráhu využívanou všemi známými TLR receptory, kromě TLR3. Jak bylo zmíněno, MYD88 se může vázat na receptorový dimer buď přímo, anebo přes TIRAP molekulu. MYD88 rekrutuje kinázy asociované s IL-1 receptorem (IRAK) a tvoří s nimi komplex označovaný jako myddozom. Následuje kaskáda dějů vedoucí fosforylaci NF- κ B inhibičního

proteinu ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), což umožní jeho degradaci. Tím je $\text{NF-}\kappa\text{B}$ uvolněn k přemístění do jádra, kde působí jako transkripční faktor indukující expresi prozánětlivých cytokinů (Duan et al. 2022)

1.3.2.2 TRIF dependentní dráha

Exprese IFN indukovaná TLR3 nebo TLR4 nezávisí na MyD88, ale je řízena TRIF molekulou. TRAM adaptor umožňuje navázání TRIF molekuly na dimerizovaný TLR4 receptor. Není jasné, zdali se v případě TLR3 receptoru navazuje TRIF přímo, nebo za využití neznámé adaptorové molekuly. Jeho navázání ale indukuje vznik trifozomu, který aktivuje buňku několika způsoby. Jedním z nich aktivace $\text{NF-}\kappa\text{B}$ a tvorba cytokinů, jako v případě myddozomu. Druhá cesta vede k dimerizaci transkripčního faktoru IRF3 (IFN regulatory factor 3). Homodimer IRF3 stimuluje expresi IFN typu I (Kawasaki a Kawai 2014).



Obr. 5: Schéma TLR aktivačních drah. Na obrázku jsou zahrnuty i regulační molekuly tlumící aktivační dráhy. (převzato z Kawasaki a Kawai 2014)

V této práci jsme se zaměřili na testování čtyř různých TLR ligandů, každý vázající se na jiný TLR receptor. Naším cílem bylo zjistit, jaký vliv má stimulace těmito aktivátory na buněčnou prozánětlivou odpověď.

2 Cíle práce

Změření a zmapování citlivosti dvou buněčných linií imunitních buněk na aktivaci pomocí různých TLR agonistů pomocí qRT-PCR, sn-ELISA a průtoková cytometrie.

Dílčí cíle:

1. Zpracovat literární rešerši na téma role PRR v zánětlivé aktivaci
2. Kultivovat buněčné kultury imunitních buněk IC-21 a PMJ2-R
3. Provést sérii aktivačních pokusů s různými TLR agonisty (LTA, POLY(I:C), FLAG, LPS)
4. Vyhodnotit aktivaci pomocí qRT-PCR, sn-ELISA a průtokové cytometrie

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie a materiál

Tab. 2: Chemické složení kultivačního média

NÁZEV	VÝROBCE	KATALOGOVÉ ČÍSLO
RPMI-1640 základní médium	Biosera	LM-R163/500
BOFES – 10%	Biosera	FB-1001B/500
1% Antibiotika – PNC, SMC	Biosera	XC-A4122/100
βME	Sigma-Aldrich	M6250

Tab. 3: Vybrané TLR aktivátory

NÁZEV	VÝROBCE	KATALOGOVÉ ČÍSLO
LPS	Sigma Aldrich	L2880-10MG
FLAG	InvivoGen	tlrl-bsfla
LTA	Merck Life Science spol	L3265-5MG
POLY(I:C)	InvivoGen	tlrl-pic

Tab. 4: Přehled materiálů pro qRT-PCR, sn-ELISA a průtokovou cytometrii

NÁZEV	VÝROBCE	KATALOGOVÉ ČÍSLO
qRT-PCR		
NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification	Macherey - Nagel	740955.250
Ethanol	VWR International	20821.321
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit cDNA Synthesis Kit	ROCHE	04897030001
FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX)	ROCHE	04913914001

RNAse Free H₂O	BioConcept	3-07F04-I
sn-ELISA		
DuoSet ELISA kit	R&D Systems	DY008
Průtoková cytometrie		
PBS	Biosera	XC-S2066
AZID	AlfaAesar	14314
BSA	biowest	P6154-500GR

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace buněčných kultur

Pro využití v experimentech byly kultivovány buněčné linie PMJ2-R a IC-21, které jsou dlouhodobě uchovávány na katedře školitele. Buňky byly uchovávány v inkubátoru při teplotě 37 °C a pasáž byla prováděna pravidelně třikrát týdně pro zaručení jejich rovnoměrného růstu. Během pasáže bylo měněno médium za čerstvé. Složení kultivačního média lze vidět v tab. 2. Dále byly použity primární buňky derivované z kostní dřeně a stimulované GM-CSF pro jejich diferenciaci na dendritické buňky a makrofágy. V práci byly použity právě makrofágy, které byly připraveny Mgr. Zuzanou Beránkovou.

3.2.2 Aktivace buněčných linií

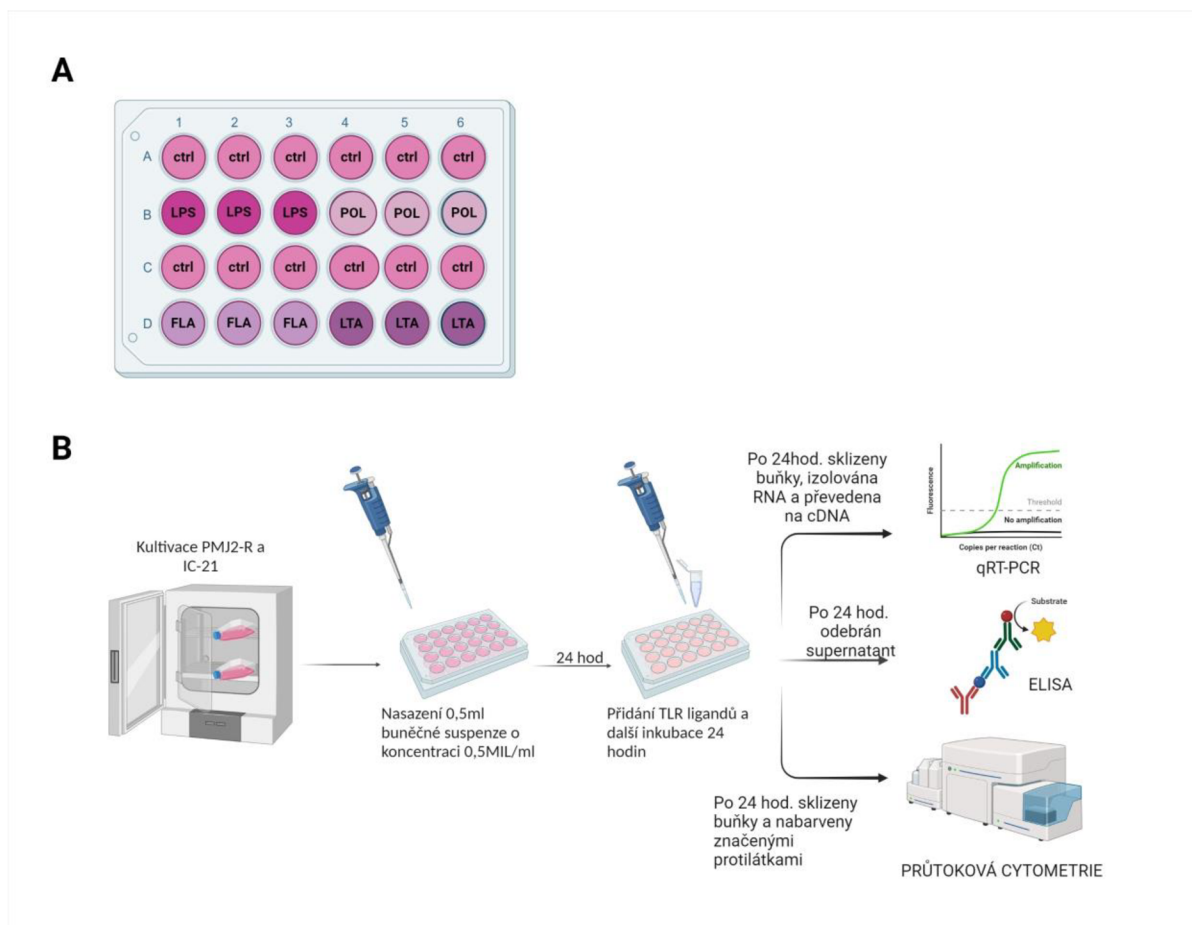
Buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a nasazeny do 24 jamkového panelu v 0,5 ml média (RPMI + 10% BOFES + GL + ATB + ME) o koncentraci $10^6/1$ ml. Před dalším postupem se nechaly 24 hodin usednout. Poté bylo buňkám vyměněno médium za 300 μ l bezsérového RPMI média a buňky byly stimulovány vybranými TLR ligandy v příslušných koncentracích za účelem navození zánětlivé reakce. Pro každý použitý ligand sloužil jeden triplikát jako neaktivovaná kontrola, a další triplikát byl stimulovaný vybraným aktivátorem. Ligandy a jejich použité koncentrace můžeme vidět v tab. 5. Buňky byly následně zpracovány v závislosti na používané metodě.

Tab. 5: Ligandy a jejich finální koncentrace použité k aktivaci

Ligand	Použitá koncentrace
LPS	500 ng/ml
FLAGELIN	100 pM
POLY (I:C)	10 μ g/ml
LTA	10 μ g/ml

Během experimentu byly buňky nejdříve stimulovány obvykle účinnou koncentrací LPS 100 ng/ml. Ukázalo se, že buňky nebyly touto koncentrací aktivovány, a pracovní koncentrace

byla tedy pro zbytek pokusů zvýšena na 500 ng/ml. Účinná koncentrace flagelinu byla stanovena podle protokolu autora Marlena A. Moore (Moors et al. 2001), zatímco koncentrace LTA byla vybrána na základě dostupné literatury (Han et al. 2006). Pracovní koncentrace POLY(I:C) byla pro náš experiment zvolena na základě jeho účinků při stimulaci plicních makrofágů (Mantov et al. 2022).



Obr. 6: A) Rozmístění aktivátorů během aktivace – pro každou buněčnou linii byl určen jeden takovýto panel B) Schematické znázornění postupu práce (použitý obrázek byl vytvořen v programu BioRender.com)

3.2.3 Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

Pro vyhodnocení aktivace buněčných linií byla zvolena míra exprese prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a IL-6, a to jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinové. Změna genové exprese vybraných proteinů byla detekována metodou qRT-PCR.

3.2.3.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí izolačního kitu NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification od firmy Macherey-Nagel. Buňkám byl 24 hodin po aktivaci odebrán supernatant a pro izolaci byly použity buňky přisedlé na destičce. Při postupu byl dodržen protokol výrobce.

Po posledním promytí byla RNA zachycená na membráně filtrační kolonky eluována 40 μ l RNase-free vody centrifugací po dobu jedné minuty na 11 000 \times g. Získaná RNA byla skladována při teplotě -80 °C.

3.2.3.2 Transkripce RNA na cDNA

Pro provedení reverzní transkripce, čili přepsání RNA do cDNA, bylo nejprve nutné změřit koncentraci výchozí RNA. K tomuto účelu byl využit spektrofotometr Synergy H1 za použití Take3-trio modulu (BioTek). Z výsledného měření bylo podle vzorku s nejnižší koncentrací určeno finální množství RNA, které bylo použito pro reverzní transkripci u všech vzorků.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Při postupu byl dodržen protokol pro standardní RT-PCR proceduru, který byl dodán výrobcem.

Všechny komponenty byly rozmrazeny, zcentrifugovány a ponechány na ledu. K H₂O (v kvalitě pro molekulární biologii) byl přidán vzorek RNA tak, aby byla v každém vzorku stejná koncentrace RNA. Následně byl přidán 1 μ l Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer v koncentraci 50 pmol/ μ l. Výsledné množství činilo 13 μ l. Dále byl připraven mastermix reagentů podle Tab. 6.

Tab. 6: Příprava mastermixu pro jednu reakci

Reagencie	Množství (μl)
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.	4
Protector RNase Inhibitor, 40U/μl	0,5
Deoxynucleotide Mix, 10mM	2
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/μl	0,5
Finální množství mastermixu pro 1 reakci	7

Mastermix byl smíchán s dříve připraveným roztokem templátu a primeru na výsledný objem reakce 20 μl a vzorky byly krátce centrifugovány, aby byl celý vzorek na dně zkumavky. Reverzní transkripce probíhala v gradientovém PCR cycleru (Biometra Tone) po dobu 30 minut při teplotě 55 °C, přičemž reverzní transkriptáza byla inaktivována 5minutovým zahříváním na 85 °C. Získané vzorky cDNA byly uchovány při -20 °C.

3.2.3.3 Stanovení exprese

Pro qPCR byl použit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) a primery navržené pro jednotlivé sledované geny (TNF, IL-1β, IL-6).

Vzorky cDNA byly rozmrazeny a 10× naředěny RNase free vodou. Byly připraveny mastermixy pro sledované geny. Dohromady byl pro každý gen připraven mastermix pro 48 reakcí (viz Tab. 7). Do jamek na destičce bylo napipetováno 13 μl mastermixu a do každé z nich bylo přidáno po dvou mikrolitrech příslušného naředěného vzorku cDNA templátu. Vyhodnocení probíhalo pomocí cycleru CFX384 (BioRad) a CFX96 (BioRad).

Tab. 7: Složení mastermixu pro qPCR

Komponenty	Množství (μl)
Supermix 2×	360
100 μl Forward Primer	1,44
100 μl Reverse Primer	1,44
Voda (PCR-grade)	261,12
Templát	96
Celkové množství mastermixu	720

Reakční podmínky qPCR byly nastaveny následovně: počáteční denaturace 95 °C/3 min, poté 40 cyklů (95 °C/10 s, 60 °C/30 s), dále denaturace 95 °C/10 s a analýza křivky tání, která začínala na 65 °C, zvyšovala se po 0,5 °C/5 s a probíhala do 95 °C.

Vyhodnocení dat probíhalo v programu Bio-Rad MAESTRO. Součástí experimentu byl i pokus pro určení vhodného referenčního genu, který byl následně při analýze používán k normalizaci výsledků. Při vyhodnocování pokusů byla brána v potaz i křivka tání za účelem odhalení syntézy více produktů.

3.2.4 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent assay (sn-ELISA)

Pro detekci produkovaných cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF α byla uplatněna metoda sn-ELISA. Proto tuto analýzu byly využity supernatanty odebrané 24 hodin po aktivaci. Pro všechny detekované cytokiny byl použit kit DuoSet ELISA (RnD systems).

Postup pro všechny detekované látky byl stejný, lišily se pouze použité koncentrace primární protilátky, standardu a detekční protilátky (viz Tab. 8).

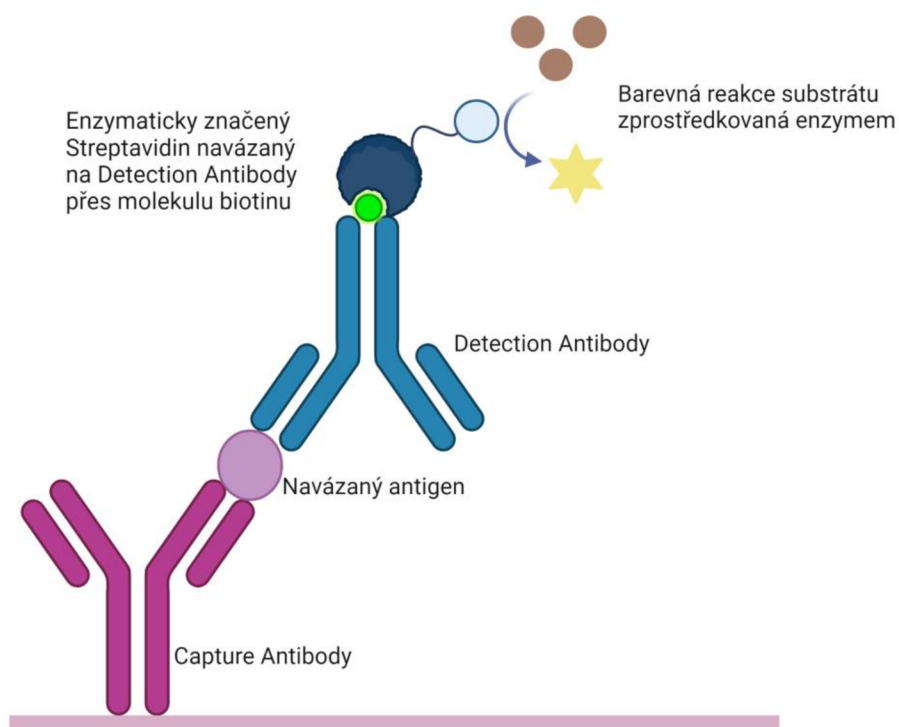
Tab. 8: Pracovní koncentrace protilátek v metodě sn-ELISA.

	TNF-α	IL-1β	IL-6
Standard	15,6 – 2000 pg/ml	15,6 – 1000 pg/ml	15,6 – 1000 pg/ml
Primární protilátka	800 ng/ml	4 μ g /ml	2 μ g/ml
Detekční protilátka	75 ng/ml	250 ng /ml	75 ng/ml

Primární protilátka byla naředěna v ELISA Plate Coating Buffer (součást kitu) na pracovní koncentraci a nakoutována na 96 jamkovou destičku v objemu 50 μ l. Destička byla přikryta fólií a víčkem a inkubována přes noc ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Následující den byla promyta 300 μ l promývacího roztoku (Wash buffer). Promytí bylo opakováno třikrát. Následovalo blokování míst pro nespecifické vazby za použití roztoku Reagent Diluent (1 \times), který byl do jednotlivých jamek napipetován po 300 μ l. Blokování probíhalo po dobu jedné hodiny ve vlhké komůrce za pokojové teploty. Destička byla dále opět třikrát promyta 300 μ l promývacího roztoku.

Do každé jamky byly přidány vzorky, a to vždy po 50 μ l. Pro vytvoření kalibrační křivky byl standard ředěn v Reagent Diluent (1 \times) na příslušné koncentrace a poté byl napipetován ve stejném množství jako vzorky. Destička byla opět přikryta fólií a víčkem a inkubována přes noc ve vlhké komůrce za pokojové teploty. Po ukončení inkubace byla destička třikrát promyta 300 μ l promývacího roztoku. Následně byla aplikována detekční protilátka, která byla předem naředěna v Reagent Diluent (1 \times) na pracovní koncentraci. Destička přikrytá víčkem byla opět inkubována ve vlhké komůrce za pokojové teploty, tentokrát po dobu 2 hodin, a poté byla opět třikrát promyta. Bylo přidáno 50 μ l Streptavidin-HRP (naředěn 1:39 v Reagent Diluent (1 \times)) do každé jamky. Další inkubace probíhala ve stejném prostředí jako ty předchozí, tentokrát však jen po dobu 20 minut. Následně promytí bylo provedeno opět 300 μ l promývacího roztoku a tentokrát bylo opakováno čtyřikrát pro zajištění kompletního odmytí Streptavidinu - HRP. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l barevného substrátu (smíchaný Color Reagent A a B v poměru 1:1) a destička byla inkubována cca 20 minut za laboratorní teploty ve tmě. Následným přidáním 50 μ l Stop Solution byla barevná reakce ukončena.

Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 450 nm na přístroji Tecan Infinite M Plex.



Obr. 7: Schématické znázornění sn-ELISA

3.2.5 Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byly detekovány povrchové markery aktivace makrofágů CD80, CD86 a MHCII.

Nejprve bylo připraveno 0,5 l FC pufru (PBS, 0,1% BSA, 0,1% AZID). Dále byly připraveny 20× ředěné pracovní roztoky protilátek.

Buňky byly sklizeny pipetou po 24 hodinách aktivace, přeneseny do 1,5 ml eppendorfek a stočeny na $500 \times g$ na 5 min při $4^\circ C$. Získaný pelet byl rozsuspendován v 1 ml promývacího pufru a přenesen do 5 ml FC zkumavek. Buňky byly stočeny na $500 \times g$ na 5 minut při $4^\circ C$. Supernatant byl odstraněn, ale bylo ponecháno cca 100 μl pufru, ve kterém byl pelet rozsuspendován. K buňkám byly přidány fluorescenčně značené protilátky v takovém množství, aby jejich finální ředění bylo 400×. Použité protilátky jsou rozepsány v tab. 9.

Tab. 9: Protilátky užívané k identifikaci povrchových antigenů

Rozpoznávaný antigen	Fluorochrom
CD 80	Fluoresceinisothiocyanate (FITC)
CD 86	Allophycocyanin (APC)
MHC II	Phycoerythrin (PE)

Poté byly vzorky inkubovány 25 min ve tmě při teplotě 4 °C. Po skončení inkubace byl ke všem vzorkům přidán 1 ml FC pufru a následovala centrifugace při 500 g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl kompletně odstraněn a pelety byly rozsuspendovány v 300 µl FC pufru.

Změna exprese zánětlivých povrchových antigenů způsobených různými aktivátory byla měřena průtokovým cytometrem NovoCyte (Agilent) s pomocí softwaru NovoExpress.

4 Výsledky

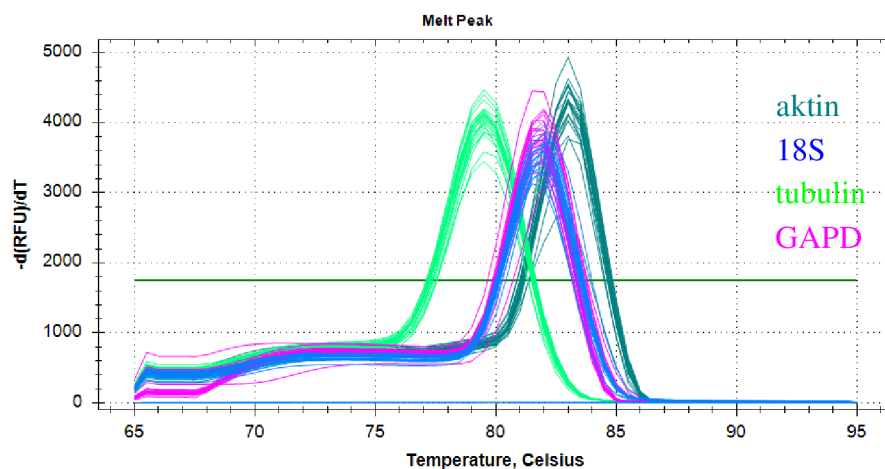
4.1 qRT-PCR

Pomocí metody qRT-PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) bylo zjištěno, jak vybrané makrofágové buněčné linie reagují na stimulaci různými TLR ligandy. Pro detekci zánětlivé reakce byla měřena změna exprese genů pro cytokiny TNF- α , IL-6 a IL-1 β . Vzorke pro tento experiment byly odebrány 24 hodin po aktivaci TLR ligandy, kdy byla z buněk izolována RNA, která byla následně přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Ta byla použita jako templát pro qPCR. Výsledky byly zpracovány v programu BIORAD Meastro. Z analýzy byly vyloučeny vzorky, u kterých byla zjištěna tvorba dvojího produktu. Průkaznost hodnot byla ověřena pomocí metody jednocestná ANOVA v programu GraphPadPrism. Pro porovnání exprese mezi jednotlivými liniemi byly výsledky vztaženy k neaktivované kontrole IC-21. Hladina statistické významnosti proti kontrole * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$.

4.1.1 Výběr referenčního genu

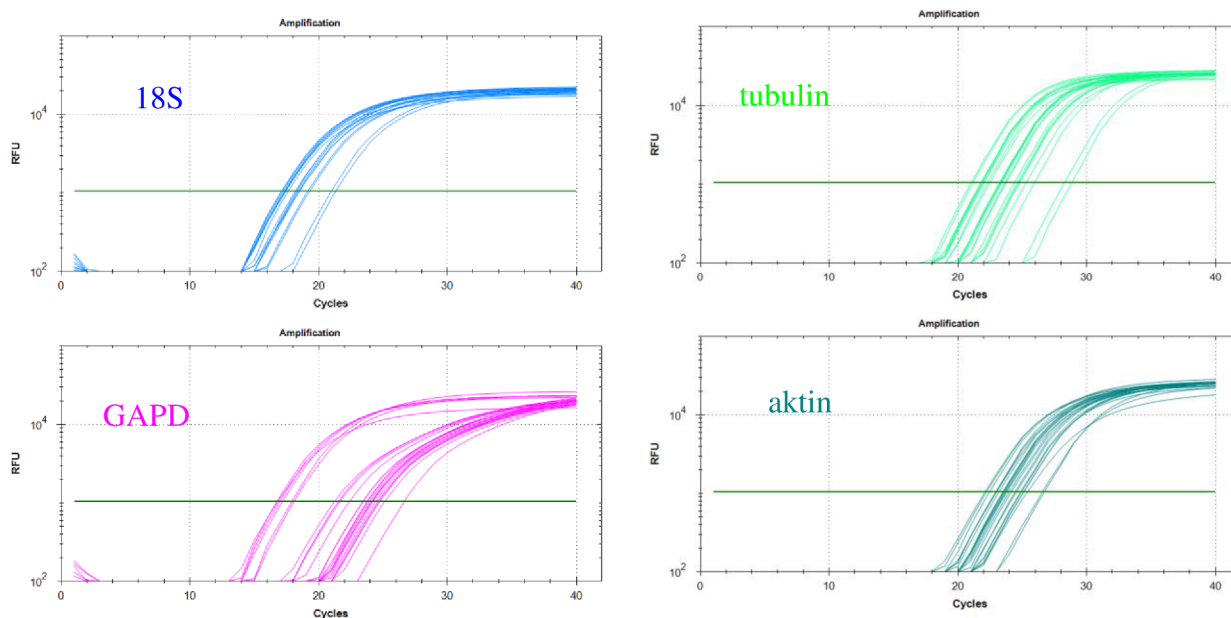
K normalizaci získaných dat bylo nejdříve zapotřebí vybrat referenční gen. Pro tento účel jsou nejčastěji používané houskeepingové geny (tedy geny potřebné pro běžný chod buňky). Proto byly vybrány a testovány čtyři geny běžně používané při této metodě: aktin, tubulin, 18S (malá podjednotka ribozomální RNA) a GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)(Thellin et al. 1999; Kozera a Rapacz 2013).

Na základě křivky tání nebyla zjištěna tvorba dvojího produktu, který by se jevil jako dva píky.



Obr. 8: Křivka tání pro testované referenční geny. Pík se objeví při teplotě, kdy dvoušroubovice produktu denaturuje na dvě samostatná vlákna. Obrázek vytvořen v programu BIORAD Maestro.

Na základě kvantifikace byly vyřazeny geny pro GAPDH a tubulin, protože vykazovaly velkou variabilitu hodnot Ct. Ze zbývajících genů byl vybrán gen 18S, protože vykazoval největší homogenitu.

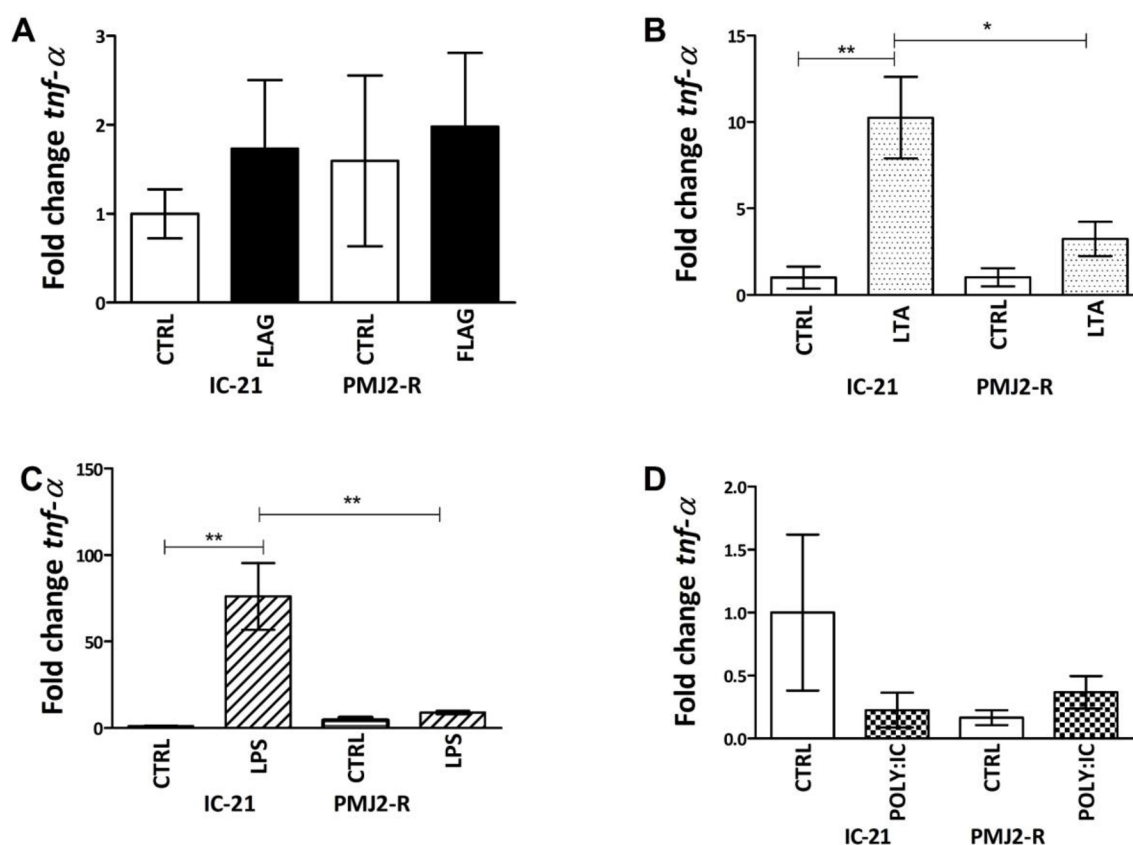


Obr. 9: qRT-PCR amplifikace, Obrázek vytvořen v programu BIORAD Maestro.

4.1.2 Výsledky qRT-PCR analýzy

4.1.2.1 Výsledky qRT-PCR analýzy *tnf-α*

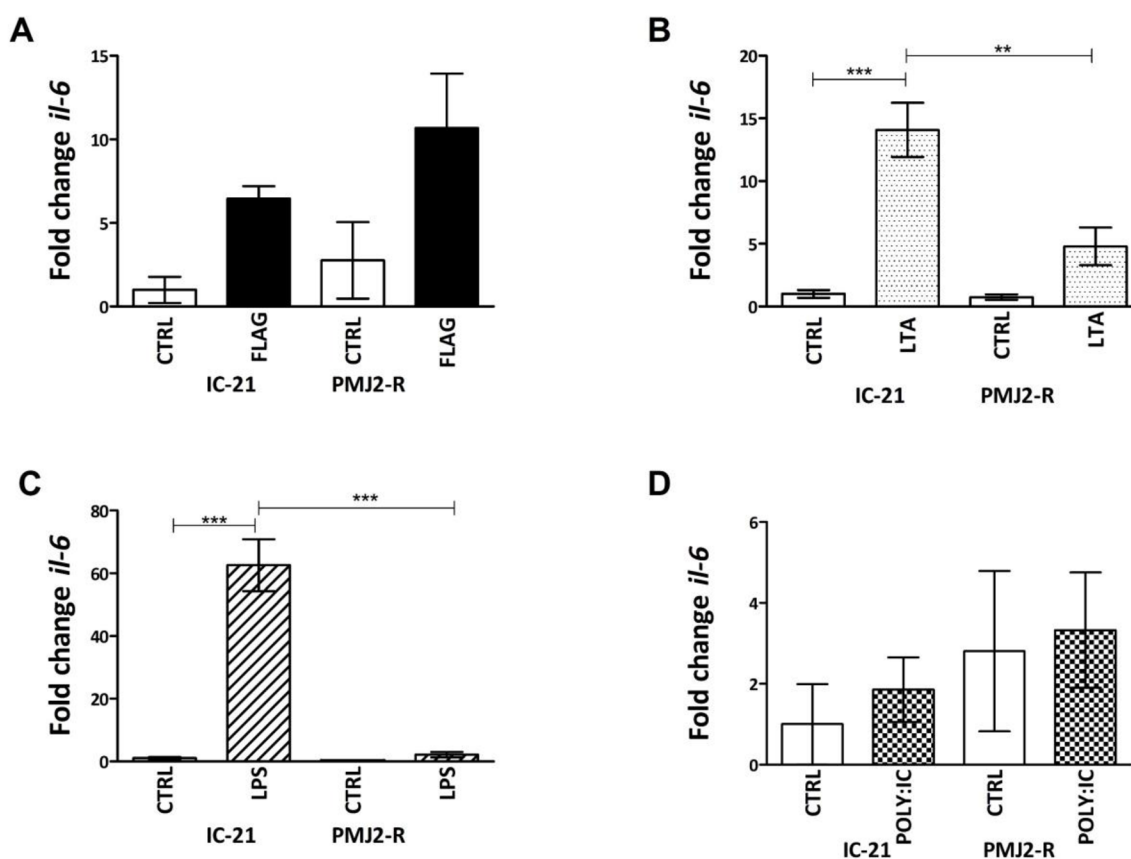
Makrofágové linie stimulované flagelinem a POLY(I:C) nevykazovaly signifikantní nárůst exprese cytokinu TNF- α ani rozdíl v expresi mezi aktivovanými skupinami testovaných linií (Obr. 10 A, D). Na grafu (obr. 10 D) pozorujeme pokles exprese *tnf-α*, nicméně odchylka měření kontrolní skupiny je příliš velká, proto není analýza spolehlivá. Po stimulaci ligandy LPS a LTA došlo k nárůstu exprese u buněk linie IC-21, zatímco stejný efekt není u linie PMJ2-R signifikantní. Rozdíl v expresi mezi aktivovanými skupinami obou linií je signifikantní a poukazuje na vyšší citlivost buněčné linie IC-21 vůči použitým aktivátorům.



Obr. 10: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese *tnf-α* 24 hodin po stimulaci ligandem: **A** – exprese *tnf-α* po stimulaci flagelinem, **B** – exprese *tnf-α* po stimulaci LTA, **C** – exprese *tnf-α* po stimulaci LPS, **D** – exprese *tnf-α* po stimulaci POLY(I:C).

4.1.2.2 Výsledky qRT-PCR analýzy exprese *il-6*

Z grafu (obr. 11) je patrný nárůst exprese u obou buněčných linií IC-21 a PMJ2-R po stimulaci všemi testovanými ligandy. Statisticky významný nárůst exprese byl potvrzen pouze u linie IC-21 stimulované LTA či LPS (obr. 11 B, C). U linie PMJ2-R stejné ligandy nezpůsobily signifikantní nárůst exprese, přestože trend je podobný jako u IC-21.

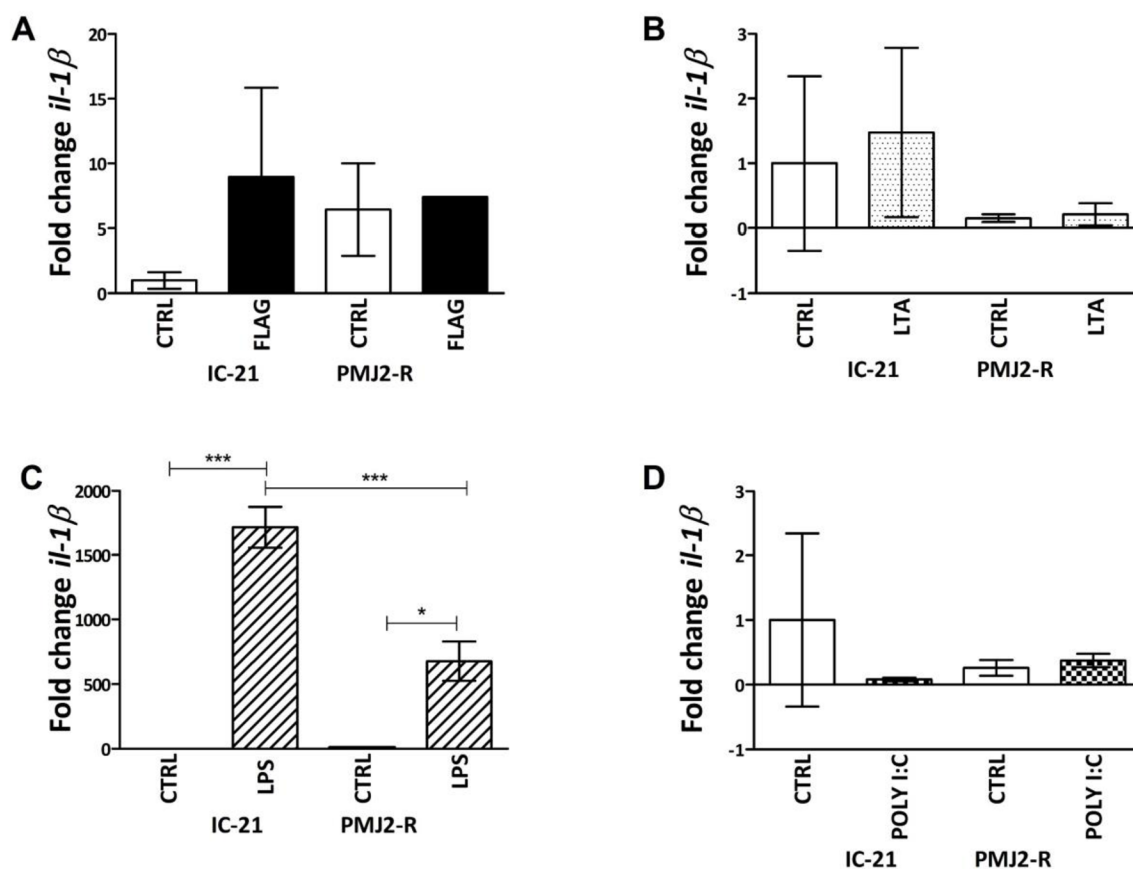


Obr. 11: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese *il-6* 24 hodin po stimulaci ligandem: **A** – exprese *il-6* po stimulaci flagelinem, **B** – exprese *il-6* po stimulaci LTA, **C** – exprese *il-6* po stimulaci LPS, **D** – exprese *il-6* po stimulaci POLY(I:C).

4.1.2.3 Výsledky qRT-PCR analýzy exprese *il-1 β*

V případě exprese *il-1 β* pozorujeme signifikantní změnu exprese mezi kontrolní a stimulovanou skupinou pouze v případě buněčných linií aktivovaných LPS (obr. 11 C). Zároveň je patrný rozdíl v expresi mezi stimulovanými skupinami jednotlivých linií, přičemž u buněčné linie IC-21 je rozdíl více jak dvounásobný. Stimulace ligandy LTA, POLY(I:C) a FLAG nejenže nepůsobila signifikantní nárůst exprese, ale v případě linie IC-21 stimulované

POLY(I:C) dokonce můžeme pozorovat pokles exprese *il-1 β* . Statistická analýza jej ovšem nepotvrdila jako signifikantní, k čemuž přispívá velká odchylka měření u kontrolní skupiny.

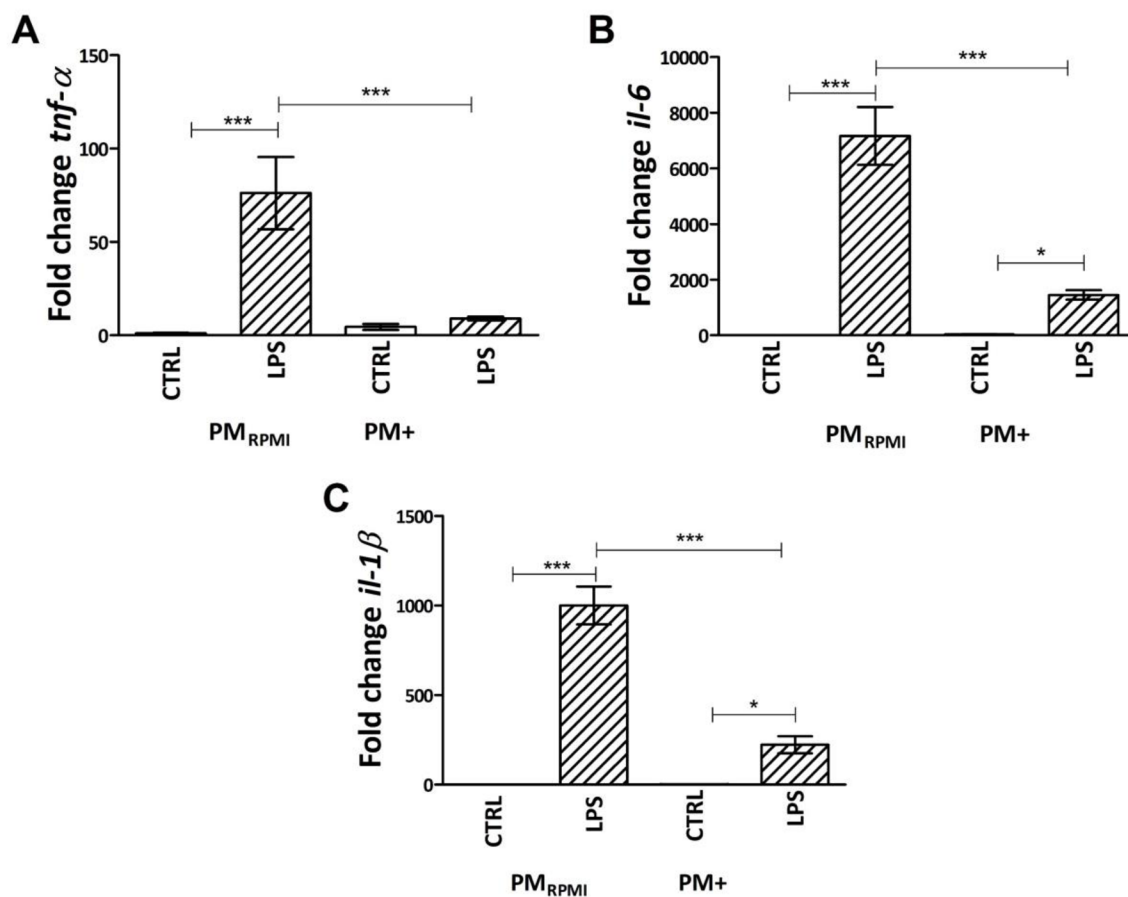


Obr. 12: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese *il-1 β* 24 hodin po stimulaci ligandem: **A** – exprese *il-1 β* po stimulaci flagelinem, **B** – exprese *il-1 β* po stimulaci LTA, **C** – exprese *il-1 β* po stimulaci LPS, **D** – exprese *il-1 β* po stimulaci POLY(I:C).

4.1.2.4 Výsledky qRT-PCR analýzy u primárních buněk stimulovaných LPS

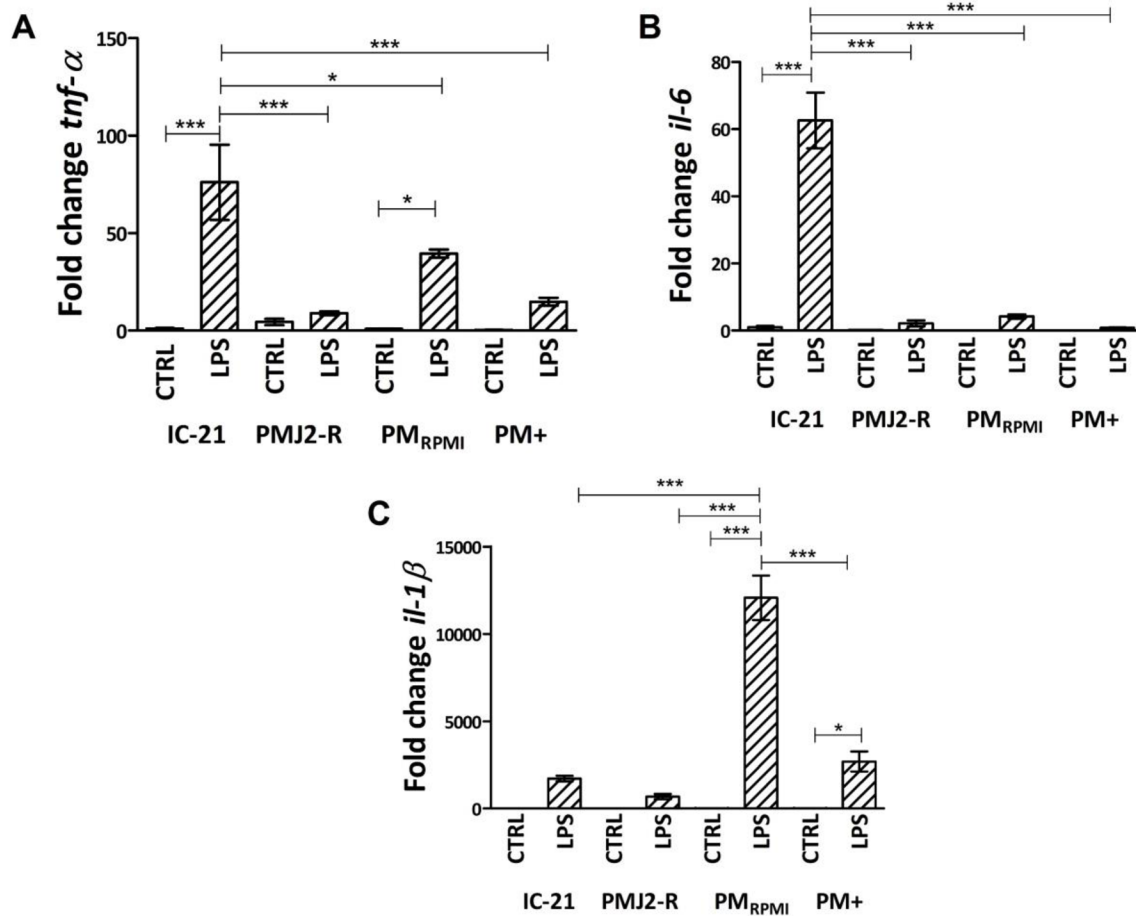
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zdali má médium použité při kultivaci primárních buněk vliv na jejich reakci při stimulaci TLR ligandy. Pro tento účel byly použity primární makrofágy kultivované v základním RPMI 1640 médiu a porovnávány byly s těmi samými buňkami kultivovanými v RPMI 1640 médiu s přidaným BOFES. Byla detekována exprese zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β . Pro porovnání exprese byly výsledky vztaženy ke kontrole PM_{RPMI}.

Z grafů (obr.13) je patrné, že stimulace LPS způsobila nárůst exprese cytokinů. Jako nesignifikantní nález určila analýza pouze nárůst exprese *tnf-α* u makrofágů s přidáním BOFES (obr. 13A, PM+). Pozorujeme, že buňky kultivované 24 hodin před aktivací v základním médiu RPMI 1640, zvýšily v reakci na stimulaci LPS expresi zánětlivých cytokinů mnohonásobně více než buňky v obohaceném médiu.



Obr. 13: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese cytokinů primárními makrofágy 24 hodin po stimulaci LPS: **A** – exprese *tnf-α*, **B** – exprese *il-6*, **C** – exprese *il-1β*.

Pro porovnání exprese cytokinů primárními makrofágy a buněčnými liniemi IC-21 a PMJ2-R po aktivaci LPS byly naměřené hodnoty vztaženy ke kontrole linie IC-21. Exprese *tnf-α* a *il-6* byla nejvýrazněji zvýšena u buněčné linie IC-21 (obr. 14 A, B), zatímco u *il-1β* pozorujeme signifikantní nárůst u primárních makrofágů kultivovaných v základním médiu RPMI (obr. 14 C).



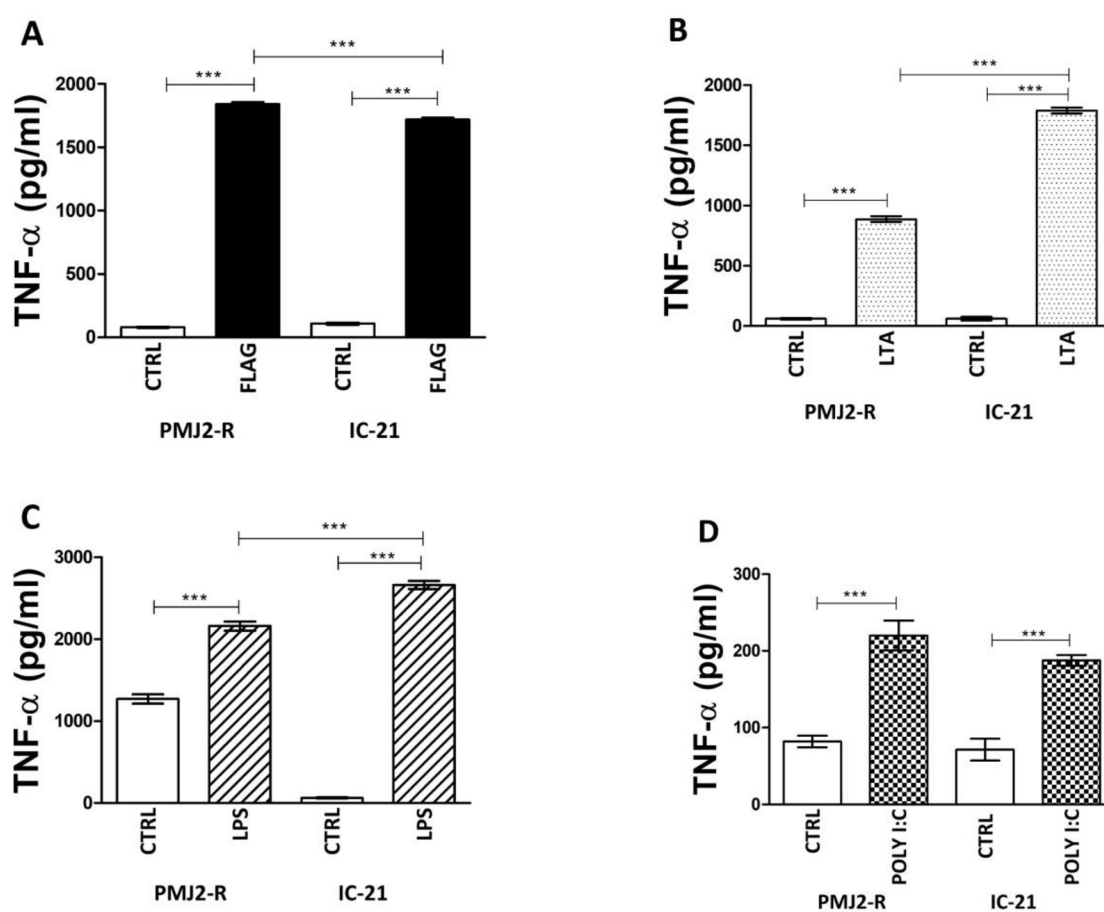
Obr. 14: Porovnání exprese cytokinů buněčnými liniemi IC-21, PMJ2-R a primárními makrofágy 24 hodin po stimulaci LPS: **A** – exprese *tnf-α*, **B** – exprese *il-6*, **C** – exprese *il-1β*.

4.2 Výsledky sn-ELISA

Tato metoda navazovala na tu předchozí a byla použita pro zjištění a porovnání koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β v supernatantech kontrolních a stimulovaných skupin makrofágových buněčných linií PMJ2-R a IC-21. Pro experiment bylo zapotřebí získat supernatant buněk po 24 hodinách inkubace s ligandy. Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel a průkaznost hodnot byla ověřena pomocí metody jednocestná ANOVA v programu GraphPadPrism. Hladina statistické významnosti proti kontrole * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

4.2.1 Koncentrace TNF- α stanovená metodou sn-ELISA

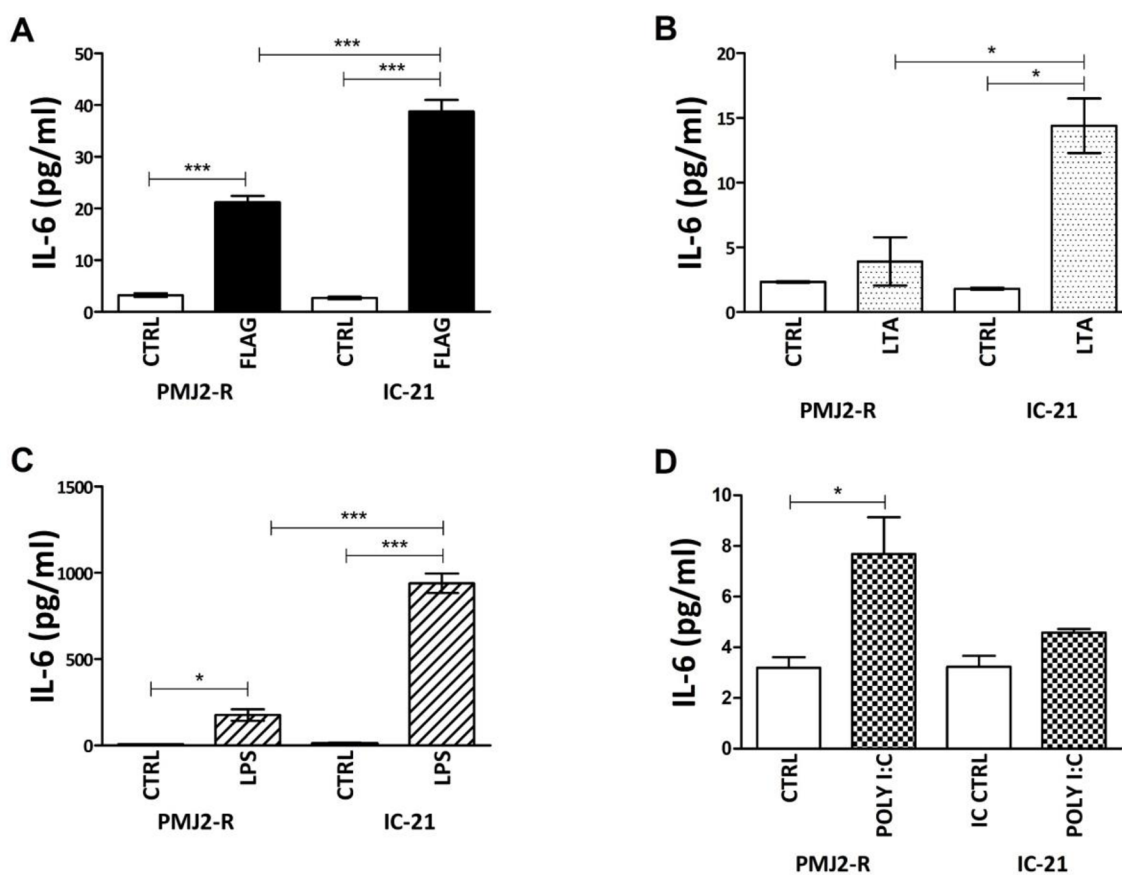
Z grafu (obr: 15) je patrné, že stimulace všemi použitými ligandy způsobila v porovnání s kontrolní skupinou signifikantní zvýšení koncentrace cytokinu TNF- α . V případě aktivace buněčných linií LTA a LPS pozorujeme výraznější zvýšení koncentrace TNF- α u linie IC-21 (obr. 15 B, C). Naproti tomu při stimulaci makrofágů FLAG se linie PMJ2-R zdá jako citlivější na použitý ligand, a koncentrace cytokinu u aktivované skupiny této linie je významně vyšší než u IC-21 (obr. 15 A). Tento trend je pozorovatelný i při stimulaci POLY(I:C), ale analýza významnost tohoto rozdílu nepotvrdila (obr. 15 D).



Obr. 15: Koncentrace TNF- α stanovená ze supernatantu 24 hodin po stimulaci TLR ligandy metodou sn-ELISA: **A** – koncentrace TNF- α po stimulaci flagelinem, **B** – koncentrace TNF- α po stimulaci LTA, **C** – koncentrace TNF- α po stimulaci LPS, **D** – koncentrace TNF- α po stimulaci POLY(I:C).

4.2.2 Koncentrace IL-6 stanovená metodou sn-ELISA

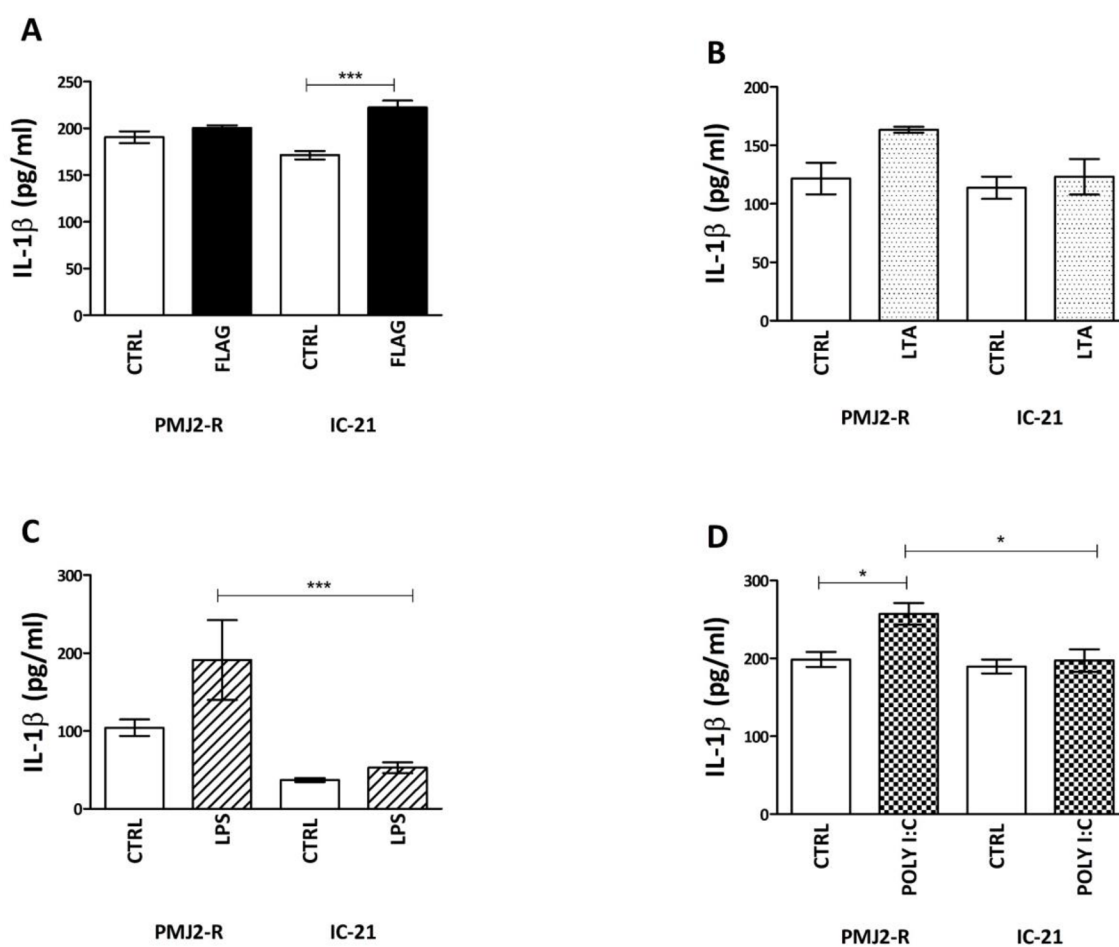
U všech měření je z grafu (obr. 16) zřejmý stejný trend, a to je zvýšení koncentrace IL-6 v supernatantu buněk v reakci na aktivaci TLR ligandem. Statistická analýza potvrdila signifikanci vzrůstu u linie PMJ2-R stimulovaných FLAG, LPS a POLY(I:C) (obr. 16 A, C, D) a zároveň i u linie IC-21 stimulovaných FLAG, LTA a LPS (obr. 16 A, B, C). Kromě makrofágových linií stimulovaných POLY(I:C) je zřejmé, že linie IC-21 reaguje na stimul mnohonásobně silněji než linie PMJ2-R. Nárůst koncentrace je nejvyšší s případě stimulace buněk LPS (obr. 16 C).



Obr. 16: Koncentrace IL-6 stanovená ze supernatantu 24 hodin po stimulaci TLR ligandy metodou sn-ELISA: **A** – koncentrace IL-6 po stimulaci flagelinem, **B** – koncentrace IL-6 po stimulaci LTA, **C** – koncentrace IL-6 po stimulaci LPS, **D** – koncentrace IL-6 po stimulaci POLY(I:C).

4.2.3 Koncentrace IL-1 β stanovená metodou sn-ELISA

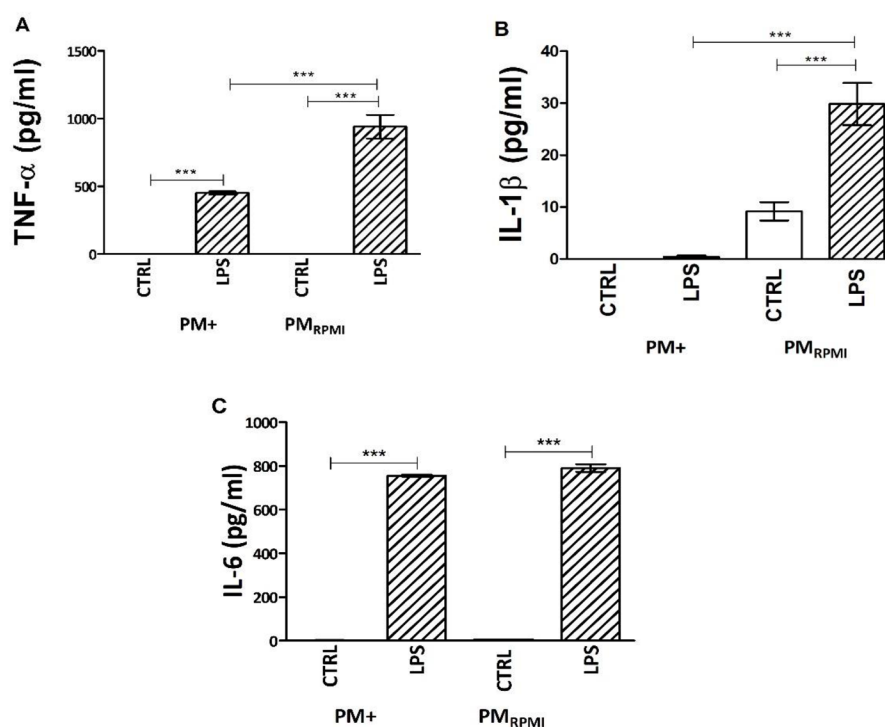
Z obrázku 17 je patrné, že koncentrace IL-1 β stoupá po stimulaci ligandem. Analýza potvrdila signifikantní nárůst v případě linie IC-21 při stimulaci FLAG a při stimulaci linie PMJ2-R ligandem POLY(I:C). Na obr. 17 C a D je patrný rozdíl v koncentraci aktivované skupiny mezi dvěma použitými liniemi PMJ2-R a IC-21, který poukazuje na vyšší citlivost PMJ2-R vůči stimulaci.



Obr. 17: Koncentrace IL-1 β stanovená ze supernatantu 24 hodin po stimulaci TLR ligandy metodou sn-ELISA: **A** – koncentrace TNF- α po stimulaci flagelinem, **B** – koncentrace TNF- α po stimulaci LTA, **C** – koncentrace TNF- α po stimulaci LPS, **D** – koncentrace TNF- α po stimulaci POLY(I:C).

4.2.4 Koncentrace cytokinů stanovena metodou sn-ELISA u primárních buněk stimulovaných LPS

Cílem experimentu bylo změřit a porovnat koncentraci zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β mezi kontrolními a stimulovanými skupinami primárních makrofágů a určit, zdali má kultivační médium vliv na aktivaci TLR ligandy. Koncentrace TNF- α (obr. 18 A) byla signifikantně zvýšena v obou případech (primární makrofágy kultivované v základním RPMI 1640 médiu i v RPMI 1640 médiu obohaceném o BOFES), nicméně v případě makrofágů kultivovaných v médiu bez přidaného séra pozorujeme signifikantně vyšší nárůst oproti makrofágům kultivovaných v médiu s BOFES. Koncentrace IL-1 β (Obr. 18 B) výrazně narostla pouze u primárních makrofágů kultivovaných v základním RPMI 1640 médiu. Z obr. 18 C je patrné, že koncentrace IL-6 je signifikantně zvýšena v obou testovaných skupinách. U buněk kultivovaných v čistém RPMI médiu je nepatrně vyšší, rozdíl ale nevykazuje statistickou významnost.

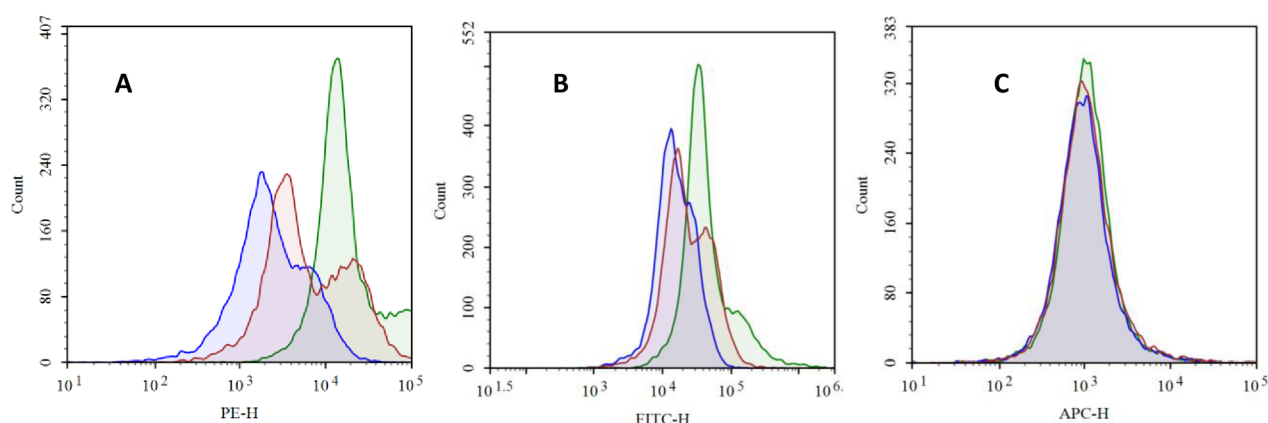


Obr. 18: Koncentrace cytokinů v buněčném supernatantu primárních buněk 24 hodin po stimulaci LPS: **A** – koncentrace TNF- α , **B** – koncentrace IL-1 β , **C** – koncentrace IL-6.

4.3 Průtoková cytometrie

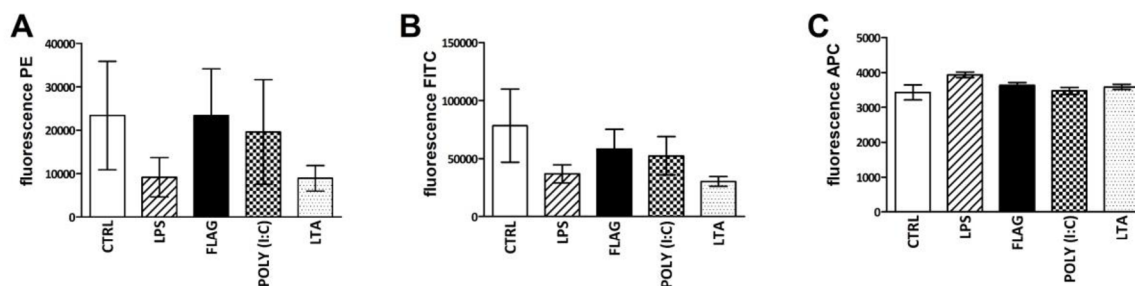
Poslední provedenou metodou byla průtoková cytometrie. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit a porovnat expresi povrchových znaků aktivace makrofágů CD80, CD86 a MHC II u buněčných linií PMJ2-R a IC-21 v jejich bazálním a aktivovaném stavu. Buňky pro experiment byly sklizeny po 24 hodinové inkubaci s vybranými TLR ligandy. Pokus se bohužel nezdařil. Jednotlivé triplikáty vykazují velkou variabilitu a nejsou proto statisticky vyhodnotitelné.

Z obr. 19 A a B je v rámci kontrolního triplikátu linie IC-21 patrná přítomnost výrazných odchylek.



Obr. 19: Kontrolní triplikát IC-21: **A** – MHC II značené PE, **B** – CD80 značené FITC, **C** – CD86 značené APC

Velikost odchylky je možné sledovat i na obr. 20, zejména na části A. Tyto grafy jsou vytvořeny pro linii IC-21 jako ukázka rozdílnosti hodnot triplikátů.



Obr. 20: IC:21 24 hodin po stimulaci TLR ligandy: **A** – MHC II značené PE, **B** – CD80 značené FITC, **C** – CD86 značené APC

5 Diskuze

Makrofágy, stejně jako jiné imunitní buňky, jsou běžně používány pro studium imunitní odpovědi na různé stimuly. Pro laboratorní účely je možné využít jak primární buňky, tak transformované buněčné linie. Výhodou primárních buněk je fakt, že se jejich vlastnosti shodují s vlastnostmi buněk *in vivo* a umožňují tak přesnější zmapování reakce v živém organismu. Na rozdíl od buněčných linií mají ovšem omezené množství dělení, a nedají se dlouhodobě kultivovat. Imortalizované buněčné linie je sice možné využívat dlouhodobě, ale pro dosažení jejich nesmrtelnosti jsou často genotypově upraveny, tudíž se fenotypově liší od buněk *in vivo*, a mohou tedy reagovat jiným způsobem (Pamies et al. 2018).

Cílem mé práce bylo stimulovat buněčné linie PMJ2-R, IC-21 a primární buňky vybranými TLR ligandy: LPS, LTA, FLAG a POLY(I:C). Následně vyhodnotit rozdíly v aktivaci v závislosti na buněčné linii a použitém aktivátoru.

Prvním krokem práce byla aktivace buněk (viz. kapitola 3.2.2. Aktivace buněčných linií) a následné zpracování vzorků pro metody sn-ELISA a qRT-PCR. Dále byl vybrán referenční gen pro normalizaci dat získaných z metody qRT-PCR. Ze čtyř testovaných genů (aktin, tubulin, 18S a GAPDH) byl pro jeho největší homogenitu hodnot Ct vybrán gen pro 18S. Výsledky získané touto analýzou jsou odlišné oproti výsledkům práce autorů Stephens et al. (2011). Ti při hledání ideálního referenčního genu pro metodu qRT-PCR pro makrofágové linie naopak dospěli k závěru, že gen pro 18S je nejvíce variabilní, přičemž variabilita genu GAPDH byla vysoká v obou experimentech (Stephens et al. 2011).

Detekce *tnf- α* pomocí qRT-PCR (obr. 10) ukázala, že aktivace FLAG vedla k viditelnému, nicméně statisticky nevýznamnému nárůstu. POLY(I:C) nezpůsobila signifikantní změnu v expresi. U linie IC-21 byl zaznamenán dokonce pokles, tento výsledek může být ale zkreslený kvůli velké odchylce v kontrolním triplikátu. Signifikantní nárůst exprese byl zaznamenán pouze po stimulaci LTA a LPS, a to u linie IC-21. Analýza exprese *il-6* přinesla podobné výsledky (obr. 11). V tomto případě byl ale zaznamenán nárůst exprese po aktivaci vybranými ligandy u obou linií. Přesto byla ale statistická významnost této změny potvrzena pouze u linie IC-21 stimulované LTA a LPS, což se shoduje s výsledky analýzy exprese *tnf- α* . V obou případech je exprese indukovaná LPS mnohonásobně vyšší než u FLAG, LTA, či POLY(I:C). V rámci studie Bian et al. (2017) autoři aktivovali makrofágy TLR ligandy LPS

a POLY(I:C), a došli ke stejnému závěru jako v této práci, a to že LPS indukuje vyšší nárůst exprese TNF- α a IL-6 než POLY(I:C) (Bian et al. 2017).

V případě exprese *il-1 β* (obr. 12) v reakci na stimulaci aktivátory byl zaznamenán signifikantní nárůst pouze u buněčných linií stimulovaných LPS. Stejně jako v předchozích měřeních je zde markantní rozdíl v expresi mezi buněčnými liniemi, kdy linie IC-21 opět reagovala na stimul výraznějším nárůstem. Ostatní ligandy nezpůsobily žádnou statisticky významnou změnu v expresi cytokinu, je ale nutné zmínit, že přítomnost velkých odchylek v měření vede ke zkreslení výsledků a statistické analýzy.

Je zřejmé, že exprese sledovaných cytokinů nebyla významně indukovaná po stimulaci POLY(I:C). Důvodem může být skutečnost, že tento ligand se váže na TLR3 receptor, který je na rozdíl od ostatních stimulovaných TLR (TLR2/1,6, TLR4, TLR5) intracelulární. POLY(I:C) je syntetický analog dsRNA, napodobující virální infekci, a aktivace TLR3 receptoru je uskutečněna TRIF-dependentní aktivační dráhou (viz. kapitola 1.2.1.1. TRIF dependentní dráha), která kromě stimulace prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF- α a IL-6 vede ke zvýšení exprese interferonů typu I (Yamamoto et al. 2002; Matsumoto et al. 2002; Yamamoto et al. 2003). Proto je možné, že aktivace buněk by byla lépe vyhodnocena, pokud by byla měřena exprese IFN- β .

Další použitou metodou byla sn-ELISA. Cílem bylo zjistit koncentraci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL 6 a IL 1 β ze supernatantů buněk sklizených pro qRT-PCR, takže tento krok přímo navazuje na ten předchozí.

Koncentrace TNF- α (obr. 15) po přidání vybraných aktivátorů signifikantně narostla u obou linií. V případě aktivace přidáním FLAG reagovala linie PMJ2-R vyšším nárůstem než linie IC-21. Ten samý trend pozorujeme i po aktivaci POLY(I:C), není ale statisticky významný. Naopak tomu bylo při použití LTA a LPS, kdy byl vyšší nárůst koncentrace cytokinu právě u IC-21. Bazální koncentrace TNF- α je u kontrolního vzorku linie PMJ2-R stimulované LPS (obr. 15 C) podezřele vysoká. Není jasné, z jakého důvodu, ale možným vysvětlením je kontaminace triplikátu během práce. Přestože statisticky významný nárůst koncentrace TNF- α byl zaznamenán i po přidání POLY(I:C), hodnoty koncentrace se i po aktivaci pohybují v řádech stovek pikogramů na mililitr, kdežto při stimulaci ligandy FLAG, LTA a LPS v řádech tisíců. Z toho lze vyvodit, že POLY(I:C) není tak dobrý stimul pro uvolnění TNF- α , jako jsou ostatní použité aktivátory, což je v souladu s daty získanými Monguió-Tortajada

et al. (2018), která porovnávají koncentraci TNF- α v buněčných supernatantech po aktivaci monocytů LPS a POLY(I:C) (Monguió-Tortajada et al. 2018). Při měření koncentrace IL-6 (obr. 16) jsem dospěla k jiným výsledkům. Ačkoli je pozorován stejný trend, a to zvýšení koncentrace v reakci na přítomnost aktivátoru, odpověď buněčných linií se liší. IC-21 reaguje signifikantně výraznějším nárůstem koncentrace IL-6 než linie PMJ2-R, a to u všech použitých ligandů kromě POLY(I:C). Nárůst koncentrace je nejvyšší v případě stimulace buněk LPS, kdy se hodnoty u aktivované linie IC-21 pohybovaly okolo 1000 pg/ml, kdežto nárůst koncentrace způsobený ostatními ligandy se pohyboval v řádu desítek, v případě POLY(I:C) dokonce jednotek, což opět souhlasí s výsledky Monguió-Tortajada et al. (2018). Koncentrace IL-1 β (Obr.17) po aktivaci stoupá, nicméně statistická signifikance této změny je potvrzena pouze v případě linie IC-21 při stimulaci FLAG, a při stimulaci linie PMJ2-R ligandem POLY(I:C).

Pro experiment byly použity dvě imortalizované buněčné linie – IC-21 a PMJ2R. IC-21 je myši peritoneální makrofágová linie získaná z myši C57BL/6 transformovaná *in vitro* virem SV40. Vykazuje mnoho společných vlastností s normálními myšimi makrofágy a exprimuje antigeny specifické pro makrofágy (Mauel a Defendi 1971). PMJ2-R buněčná kultura je také peritoneální makrofágová linie získaná z myšního kmene C57BL/6J. Jejich transformace je umožněna *in vivo* infekcí myši virem J2 nesoucího onkogeny v-raf a v-myc. V mnohém se podobají primárním makrofágům, ale jsou zde patrné rozdíly v jejich reakci na vnější stimuly. PMJ2-R také exprimuje vysoké hladiny mRNA pro CSF-1 receptor, který je exprimován například monocyty a je nutný pro jejich proliferaci a diferenciaci na makrofágy (Adami et al. 1993). To by mohlo být bráno jako známka menší míry diferenciaci PMJ2-R oproti IC-21. Ve většině případů reagovala linie IC-21 na stimulaci ligandy citlivěji než PMJ2-R. To by mohlo být způsobeno právě vyšším stupněm diferenciaci této linie.

Ze získaných dat plyne, že LPS je nejvhodnějším ligandem pro indukci produkce prozánětlivých cytokinů. Studie provedená Saito et al. (2020) nabízí jako jeden z důvodů tohoto efektu fakt, že receptor TLR4 je na buňkách (v rámci experimentu byly použity BMDM) exprimován v porovnání s TLR1, TLR2, TLR3 a TLR7 nejčastěji. Korelace exprese receptoru s množstvím produkovaných cytokinů byla dokázána stimulací těchto receptorů jejich ligandy a následnou kvantifikací TNF- α metodou sn-ELISA. Stejný experiment vyhodnotil expresi TLR3 jako nejnížší ze všech sledovaných receptorů, což může být další faktor nízké exprese cytokinů po stimulaci POLY(I:C). Naproti tomu TLR2 byl na testovaných

buňkách exprimován poměrně hojně (Saito et al. 2020). V experimentu provedeném Quero et al. (2017) porovnávali bazální expresi TLR4 a TLR2 u BMDM makrofágů, a také došli k závěru, že TLR4 je exprimován ve větší míře nežli TLR2 (Quero et al. 2017). To by mohl být důvod, proč stimulace LTA vedla k úspěšnému nárustu exprese a koncentrace cytokinů TNF- α a IL-6, ale ne v tak veliké míře jako při aktivaci LPS. Tyto výsledky jsou ale v rozporu s nálezem Saito et al. (2020), který naopak ukázal velmi nízký nárůst koncentraci TNF- α po stimulaci LTA, a dokonce došel k závěru, že LTA působí protizánětlivě (Saito et al. 2020).

Zdá se, že flagelin vykazuje nižší účinky při aktivaci prozánětlivé odpovědi u sledovaných buněčných linií než LPS či LTA. Možné vysvětlení nabízí výzkum autorů Feng et al. (2012), který odhalil skutečnost, že TLR5 (receptor pro flagelin) je exprimovaný nejhojněji na epiteliálních a dendritických buňkách vyskytujících se ve střevě, kdežto IC-21 a PMJ2-R jsou původem peritoneálního makrofágy (Feng et al. 2012). Přesto má přítomnost flagelinu signifikantní vliv na koncentraci TNF- α v buněčném supernatantu, což je v souladu se studií Chamberlain et al. (2012).

Výsledky získané metodami qRT-PCR a sn-ELISA se zdají být v některých případech v rozporu. Například je patrný nesoulad výsledků pro TNF- α . Exprese tohoto cytokinu sice zaznamenala nárůst, hlavně po stimulaci LPS a LTA, ale ne tak markantní jako byl nárůst koncentrace proteinu v buněčném supernatantu. Důvodem tohoto rozdílu může být fakt, že TNF- α existuje v podobě transmembránového prekurzoru, ze kterého může být proteolyticky štěpen na rozpustný TNF- α TACE enzymem. Li et al. (2002) ve svém experimentu zjistili, že LPS právě toto štěpení aktivuje. Také nejenže stimuluje zvýšení exprese *tnf- α* , ale i genu právě pro tento enzym (Li et al. 2002). Výsledky získané v mé práci jsou v rozporu se zjištěním Favre et al. (1997), kteří naopak detekovali nárůst v expresi *tnf- α* , ale sn-ELISA neodhalila nárůst koncentrace cytokinu. Nicméně je nutné podotknout, že aktivace v této práci probíhala *in vivo* (injikací anti-CD3).

Dále je patrné, že exprese IL-1 β se výrazně zvyšuje po stimulaci LPS. Stejný efekt ale není pozorován při detekci koncentrace cytokinu ze supernatantu metodou sn-ELISA. Důvodem může být fakt, že sekrece IL-1 β není přímočará. Nejprve je totiž tvořen prekurzor pro-IL-1 β , který se hromadí v cytosolu. Tento prekurzor je štěpen kaspázou-1 (pro její aktivaci je ale nutný druhý signál), a až poté je IL-1 β buňkou sekretován (Thornberry et al. 1992; Stoffels et al. 2015).

Z toho vyplývá, že metody použité pro experiment musí být vhodně zvoleny na základě látek, které mají být detekovány. Metoda qRT-PCR je vhodná pro přesné stanovení změny transkripce v reakci na podnět. Nevýhodou je, že nemusíme znát intracelulární mechanismus předcházející sekreci této látky vně buňku. Transkript může být regulačními mechanismy zničen, či musí být pro uvolnění aktivní formy přítomny jiné stimuly. ELISA naopak podává informaci o reálné buněčné sekreci látek, kterou ovlivňují své okolí. Abychom získali co nejkompexnější informace, je vhodné využít více metod.

Dalším krokem v mé práci bylo zjistit, zdali má přítomnost séra v kultivačním médiu vliv na reakci buněk při stimulaci použitými TLR ligandy. Pro experiment byla část myších primárních makrofágů kultivovaná v základním RPMI 1640 médiu, a část v RPMI 1640 médiu s přidaným BOFES.

Metodou qRT-PCR bylo zaznamenáno zvýšení exprese cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β u obou populací (obr. 13). Mezi nimi byl ovšem zjištěn signifikantní rozdíl, kdy buňky kultivované v bezsérovém RPMI 1640 médiu vykazují mnohonásobně vyšší expresi, než je exprese u stejných buněk kultivovaných v médiu s přidaným BOFES.

Tento nálezn je ovšem v rozporu se studií provedenou Flesch a Kaufmann (1999), která naopak tvrdí, že koncentrace cytokinů výrazněji stoupá u primárních buněk kultivovaných za přítomnosti séra. Z této práce ale také vyplývá, že sérum obsahuje nedefinované faktory, které buňky preaktivují, což může zkreslit výsledky experimentů (Flesch a Kaufmann 1999). Proto protokol podle Toda et. al (2021) doporučuje před stimulací buněk krátké období kultivace bez séra, které umožňuje přesnější detekci hledaného signálu (Toda et al. 2021).

Největší změna v expresi byla zaznamenána u genu *il-6*. Tato reakce se liší od výsledků studie provedené Sakuma et al. (2012), kde změna exprese TNF- α primárními makrofágy stimulovanými LPS byla nejmarkantnější.

Pro porovnání exprese cytokinů mezi primárními makrofágy a buněčnými liniemi IC-21 a PMJ2-R po aktivaci LPS byly naměřené hodnoty vztaženy ke kontrole linie IC-21 (obr. 14). Z tohoto porovnání vyplývá, že exprese cytokinů *tnf- α* a *il-6* byla nejvýraznější u buněčné linie IC-21. Naproti tomu exprese *il-1 β* byla nejvýrazněji zvýšena u primárních makrofágů kultivovaných v bezsérovém médiu. V práci Chamberlain et al. (2009) naopak došli k závěru, že primární makrofágy reagovali na LPS citlivěji, než linie IC-21, a to i přesto že IC-21 exprimuje na svém povrchu markery diferenciované makrofágové linie (Chamberlain et al. 2009).

Supernatanty odebrané 24 hodin po aktivaci primárním buňkám byly využity při metodě sn-ELISA. Cílem experimentu bylo změřit a porovnat koncentraci zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1 β mezi kontrolními a stimulovanými skupinami primárních makrofágů a určit, zdali má kultivační médium vliv na aktivaci TLR ligandy. Byl pozorován podobný trend jako u immortalizovaných buněčných linií, kdy hladiny TNF- α a IL-6 výrazně narostli po stimulaci LPS, ale koncentrace IL-1 β takových hodnot nedosáhla (obr. 18). Tyto výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou autorů (Aznar et al. 1990; Sakuma et al. 2012). Opět se zdá, že primární makrofágy kultivované v bezsérovém médiu reagují lépe než buňky v médiu přidaným BOFES.

Posledním krokem práce byla analýza exprese povrchových molekul CD80, CD86 a MHC II u buněčných linií PMJ2-R a IC-21 za využití průtokové cytometrie. Cíkem pokusu bylo zjistit a porovnat expresi těchto struktur v závislosti na stimulaci různými TLR ligandy.

Celá škála povrchových molekul hraje roli při prezentaci antigenů (viz. kapitola 1.1.3. Povrchové znaky aktivace imunitních buněk) a jejich exprese se mění v závislosti na stimulaci buňky. CD80, CD86 a MHC II byly pro experiment vybrány na základě publikovaných studií, které zvýšení jejich exprese na buněčném povrchu využívaly jako indikátor aktivace buněk (Saito et al. 2020; Jiménez-Uribe et al. 2019).

Pokus se bohužel nezdařil. Jednotlivé triplikáty vykazují velkou variabilitu, a proto nejsou získané hodnoty statisticky vyhodnotitelné. Není jasné, v jakém stádiu pokusu došlo k chybě, nicméně se zdá, že fluorescenční značení bylo aplikováno správně. S největší pravděpodobností tedy chyba nastala při výměně média za bezsérové RPMI a přidáním TLR ligandů. Mohlo dojít k neopatrnému přidání aktivátorů, či kontaminaci triplikátů. Řešením by tedy bylo opakování experimentu, pro což už nebyl z časových důvodů prostor.

V experimentu byly využity peritoneální makrofágové linie získané z jednoho myšího kmene (C57BL/6). Makrofágový fenotyp je ale ovlivněn i lokálním mikroprostředím, ve kterém se buňky nachází. Proto studie Stevense et al. (2021) porovnávala dvě buněčné linie získané taktéž z C57BL/6, ale s různým tkáňovým původem, jmenovitě peritoneální makrofágy IC-21 a alveolární AMJ2-C11. Jejich pokus odhalil rozdíly v expresi cytokinů v reakci na infekci mikroorganismem (Stevens et al. 2021). Proto by bylo vhodné do pokusu zařadit i buněčné linie pocházející z jiných tkání.

Dále by bylo přínosné pro lepší výpovědní hodnotu pokus zopakovat s vícero koncentracemi jednotlivých ligandů, což ale nebylo z časových a finančních důvodů možné. Protože v práci byla použita POLY(I:C), což je ligand pro intracelulární TLR3 receptor, bylo by vhodné detekovat kromě TNF- α , IL-6 a IL-1 β i IFN- β .

6 Závěr

V této práci se podařilo otestovat aktivaci TLR ligandy LPS, LTA, FLAG a POLY(I:C) u peritoneálních makrofágových linií IC-21, PMJ2-R a primárních makrofágů derivovaných z kostní dřeně.

Z testovaných buněčných linií byla stanovena jako nejcitlivější linie IC-21. Nejúčinnějším aktivátorem se ukázal být TLR4 ligand LPS. Naopak stimulace POLY(I:C) hodnoty sledovaných prozánětlivých cytokinů oproti kontrolním triplikátům příliš nepozměnila. Primární makrofágy reagovaly na stimulaci LPS citlivěji, když byly kultivované v bezsérovém médiu.

Také byla zaznamenána nesrovnalost mezi expresí a koncentrací některých cytokinů. U TNF- α pozorujeme v supernatantu vysoké množství proteinu, ale exprese měřená metodou qRT-PCR neukázala stejný nárůst. Naopak je tomu u IL-1 β , kdy byl zaznamenán výrazný nárůst exprese po stimulaci LPS, ale koncentrace cytokinu v supernatantu těchto buněk měřená metodou sn-ELISA zdaleka nedosahuje hodnot jako u TNF- α či IL-6.

Pro věrohodnější vyhodnocení účinnosti jednotlivých ligandů by bylo vhodné pokus zopakovat i s jinými koncentracemi aktivátorů.

7 Seznam zkrtek

(SOCS)-1	Supresor cytokinové signalizace 1
ALRs	AIM2-like receptory
AP-1	Aktivátorový protein 1
APC	Antigen prezentující buňky
BCAP	B-cell adaptor for phosphoinositide
BMDM	Makrofágy derivované z kostní dřeně
BOFES	Bovinní fetální serum
BSA	Bovinní sérový albumin
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CD	Diferenční skupina
CLC	Kardiotrofinu podobný cytokin
CLR	C-type lectin receptor
CNTF	Ciliární neurotrofický faktor
CRP	C-reaktivní protein
CSF-1	Kolonie stimulující faktor 1
CT-1	Kardiotrofin 1
CTD	C-koncová doména
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAMPs	Molekulární vzorce asociované s poškozením
DC	Dendritické buňky
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	Dvouvláknová RNA
EMP	Erytromyeoidní progenitor
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FLAG	Flagelin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GM-CSF	Granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor
HIN 200	Hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins
HRP	Křenuvina peroxidáza
ICAM	Intracelulární adhezivní molekula
iE-DAP	γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelková kyselina
IL-36Ra	Interleukin 36 receptor antagonist
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IRAK	Kinázy asociované s IL-1 receptorem
IRF3	Interferon regulatory factor 3
LIF	Leukemický inhibiční faktor
LPS	Lipopolysacharid
LRR	Leucin Rich Repeat
LTA	Lipoteichoová kyselina
MDP	Muramyl dipeptid
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	Messenger ribonukleová kyselina
MyD88	Myeloidní diferenční protein primární odpovědi
NACHT	Nukleotid vazebná doména

NETs	Neutrofilní extracelulární past
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NFAT	Nukleární faktor aktivovaných T buněk
NK buňky	natural killer buňky
NLR	Nucleotide Binding Oligomerization Domain Like Receptor
NTD	N-koncová doména
OS	Oxidační stres
OSM	Onkonstatin M
PAMPs	Molekulární vzory na povrchu patogenních buněk
PBS	Phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PE	Phycoerythrin
PM	Primární makrofágy
PNC	Penicilin
POLY(I:C)	Kyselina polyinosinová–polycytidylová
PRRs	Receptory pro rozpoznávání vzorců
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand-1
qRT-PCR	Polymerázová řetězová reakce probíhající v přítomném čase
RLR	RIG-1 like receptor
RNA	Ribonukleová kyselina
SARM	Sterile α - and armadillo-motif-containing protein
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
SMC	Streptomycin
sn-ELISA	Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
SV40	opičí vakuolizující virus 40
TACE	TNF- α -konvertující enzym
TGF-β	Transformující růstový faktor
T_H	T-helpers
TIR	Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain- containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor nekrotizující faktor α
TNFR	TNF receptor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
βME	β -mercaptoethanol

8 Literatura

ADAMI, Cecilia, Michael J BRUNDA a Alicia V PALLERONI, 1993. In vivo immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. **53**(4), 475–478. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1002/jlb.53.4.475

AKIRA, Shizuo, Satoshi UEMATSU a Osamu TAKEUCHI, 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* [online]. **124**(4), 783–801. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.02.015

ALI IMANI FOOLADI, Abbas, Seyed FAZLOLLAH MOUSAVI, Sepideh SEGHATOLESLAMI, Samaneh YAZDANI a Mohammad REZA NOURANI, 2011. Toll-Like Receptors: Role in Inflammation and Commensal Bacteria. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* [online]. **10**(3), 198–207. ISSN 18715281. Dostupné z: doi:10.2174/187152811795564064

AZNAR, Christine, Catherine FITTING a Jean Marc CAVAILLON, 1990. Lipopolysaccharide-induced production of cytokines by bone marrow-derived macrophages: Dissociation between intracellular interleukin 1 production and interleukin 1 release. *Cytokine* [online]. **2**(4). ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/1043-4666(90)90026-P

BARTON, Gregory M., 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **118**(2), 413–420. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI34431

BEHZADI, Payam, Herney Andrés GARCÍA-PERDOMO a Tomasz M. KARPÍŃSKI, 2021. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *Journal of Immunology Research* [online]. **2021**, 1–21. ISSN 2314-7156. Dostupné z: doi:10.1155/2021/9914854

BIAN, Hong Jun, Feifei LI, Wenwen WANG, Qi ZHAO, Shanshan GAO, Jincan MA, Xiao LI, Wanhua REN, Cheng Yong QIN a Jianni QI, 2017. MAPK/p38 regulation of cytoskeleton rearrangement accelerates induction of macrophage activation by TLR4, but not TLR3. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. **40**(5). ISSN 1791244X. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2017.3143

BISWAS, Subhra K., Manesh CHITTEZHATH, Irina N. SHALOVA a Jyue-Yuan LIM, 2012. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic Research* [online]. **53**(1–3), 11–24. ISSN 0257-277X. Dostupné z: doi:10.1007/s12026-012-8291-9

BOTOS, Istvan, David M. SEGAL a David R. DAVIES, 2011. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure* [online]. **19**(4), 447–459. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2011.02.004

BRANNON, Emma R., M. Valentina GUEVARA, Noah J. PACIFICI, Jonathan K. LEE, Jamal S. LEWIS a Omolola ENIOLA-ADEFESO, 2022. Polymeric particle-based therapies for acute inflammatory diseases. *Nature Reviews Materials* [online]. **7**(10), 796–813. ISSN 2058-8437. Dostupné z: doi:10.1038/s41578-022-00458-5

- BRUBAKER, Sky W., Kevin S. BONHAM, Ivan ZANONI a Jonathan C. KAGAN, 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology* [online]. **33**(1), 257–290. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- CARSWELL, E A, L J OLD, R L KASSEL, S GREEN, N FIORE a B WILLIAMSON, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **72**(9), 3666–3670. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.72.9.3666
- DIEHL, Sean a Mercedes RINCÓN, 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* [online]. **39**(9), 531–536. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9
- DUAN, M, D P STEINFORT, D SMALLWOOD, M HEW, W CHEN, M ERNST, L B IRVING, G P ANDERSON a M L HIBBS, 2016. CD11b immunophenotyping identifies inflammatory profiles in the mouse and human lungs. *Mucosal Immunology* [online]. **9**(2), 550–563. ISSN 19330219. Dostupné z: doi:10.1038/mi.2015.84
- DUAN, Tianhao, Yang DU, Changsheng XING, Helen Y. WANG a Rong-Fu WANG, 2022a. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology* [online]. **13**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.812774
- DUAN, Tianhao, Yang DU, Changsheng XING, Helen Y. WANG a Rong-Fu WANG, 2022b. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology* [online]. **13**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.812774
- EL-ZAYAT, Salwa Refat, Hiba SIBAI a Fathia A. MANNAA, 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre* [online]. **43**(1), 187. ISSN 2522-8307. Dostupné z: doi:10.1186/s42269-019-0227-2
- FAVRE, Nicolas, Gérard BORDMANN a Werner RUDIN, 1997. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* [online]. **204**(1). ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(97)00033-1
- FENG, Ting, Yingzi CONG, Katie ALEXANDER a Charles O. ELSON, 2012. Regulation of Toll-like Receptor 5 Gene Expression and Function on Mucosal Dendritic Cells. *PLoS ONE* [online]. **7**(4), e35918. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035918
- FIORANELLI, Massimo, Maria Grazia ROCCIA, Dana FLAVIN a Linda COTA, 2021. Regulation of Inflammatory Reaction in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(10), 5277. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22105277
- FLESCH, Inge E.A. a Stefan H.E. KAUFMANN, 1999. Effect of fetal calf serum on cytokine release by bone marrow-derived macrophages during infection with intracellular bacteria. *Immunobiology* [online]. **200**(1). ISSN 01712985. Dostupné z: doi:10.1016/S0171-2985(99)80037-0

GALLUCCI, Stefania, Martijn LOLKEMA a Polly MATZINGER, 1999. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine* [online]. **5**(11), 1249–1255. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/15200

GARLANDA, Cecilia, Charles A. DINARELLO a Alberto MANTOVANI, 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* [online]. **39**(6), 1003–1018. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010

GAY, Nicholas J., Monique GANGLOFF a Alexander N. R. WEBER, 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews Immunology* [online]. **6**(9), 693–698. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1916

GEIJTENBEEK, Teunis B. H. a Sonja I. GRINGHUIS, 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* [online]. **9**(7), 465–479. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2569

HAN, Seung Hyun, Je Hak KIM, Ho Seong SEO, Michael H. MARTIN, Gook-Hyun CHUNG, Suzanne M. MICHALEK a Moon H. NAHM, 2006. Lipoteichoic Acid-Induced Nitric Oxide Production Depends on the Activation of Platelet-Activating Factor Receptor and Jak2. *The Journal of Immunology* [online]. **176**(1), 573–579. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.176.1.573

HOLLING, Tjadine M, Erik SCHOOTEN a Peter J VAN DEN ELSEN, 2004. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Human Immunology* [online]. **65**(4), 282–290. ISSN 01988859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2004.01.005

CHAMBERLAIN, Lisa M., Marisha L. GODEK, Mercedes GONZALEZ-JUARRERO a David W. GRAINGER, 2009. Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. **88A**(4), 858–871. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31930

CHAMBERLAIN, Nathan D., Olga M. VILA, Michael V. VOLIN, Suncica VOLKOV, Richard M. POPE, William SWEDLER, Arthur M. MANDELIN a Shiva SHAHRARA, 2012. TLR5, a Novel and Unidentified Inflammatory Mediator in Rheumatoid Arthritis that Correlates with Disease Activity Score and Joint TNF- α Levels. *The Journal of Immunology* [online]. **189**(1), 475–483. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1102977

CHAVAKIS, Emmanouil, Eun CHOI a Triantafyllos CHAVAKIS, 2009. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. **102**(08), 191–197. ISSN 0340-6245. Dostupné z: doi:10.1160/TH08-12-0844

CHEN, Chun-Jen, Hajime KONO, Douglas GOLENBOCK, George REED, Shizuo AKIRA a Kenneth L ROCK, 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine* [online]. **13**(7), 851–856. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1603

IBRAHIM, Sherif, Michael KEATING, Kim-Anh DO, Susan O'BRIEN, Yang O. HUH, Iman JILANI, Susan LERNER, Hagop M. KANTARJIAN a Maher ALBITAR, 2001. CD38

expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [online]. **98**(1), 181–186. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V98.1.181

JANEWAY, Charles A, Paul TRAVERS, WALPORT. MARK a Mark J SHLOMCHIK, 2001. *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. 5. vyd. New York: Garland Science.

JIMÉNEZ-URIBE, Alexis P., Hugo VALENCIA-MARTÍNEZ, Gregorio CARBALLO-UICAB, Luis VALLEJO-CASTILLO, Emilio MEDINA-RIVERO, Rommel CHACÓN-SALINAS, Lenin PAVÓN, Marco A. VELASCO-VELÁZQUEZ, Gabriela MELLADO-SÁNCHEZ, Sergio ESTRADA-PARRA a Sonia M. PÉREZ-TAPIA, 2019. CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *Journal of Immunology Research* [online]. **2019**, 1–9. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2019/2198508

KALLIOLIAS, George D. a Lionel B. IVASHKIV, 2016. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology* [online]. **12**(1), 49–62. ISSN 1759-4790. Dostupné z: doi:10.1038/nrrheum.2015.169

KANY, Shinwan, Jan Tilmann VOLLRATH a Borna RELJA, 2019. Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(23), 6008. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20236008

KAWASAKI, Takumi a Taro KAWAI, 2014. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* [online]. **5**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00461

KEARNEY, E R, T L WALUNAS, R W KARR, P A MORTON, D Y LOH, J A BLUESTONE a M K JENKINS, 1995. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *The Journal of Immunology* [online]. **155**(3), 1032–1036. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.155.3.1032

KOZERA, Bartłomiej a Marcin RAPACZ, 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* [online]. **54**(4), 391–406. ISSN 1234-1983. Dostupné z: doi:10.1007/s13353-013-0173-x

LEE, Keum Hwa, Andreas KRONBICHLER, David Duck-Young PARK, YoungMin PARK, Hanwool MOON, Hyungdo KIM, Jun Hyug CHOI, YoungSeo CHOI, Songjoo SHIM, Il Suk LYU, Byung Hwan YUN, Yeonseung HAN, Donghee LEE, Sang Yoon LEE, Byung Hun YOO, Kyung Hwan LEE, Tai Lim KIM, Heonki KIM, Joo Sung SHIM, Wonseok NAM, Heesung SO, SooYeon CHOI, Sangmok LEE a Jae Il SHIN, 2017. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews* [online]. **16**(11), 1160–1173. ISSN 15689972. Dostupné z: doi:10.1016/j.autrev.2017.09.012

LEY, Klaus, Carlo LAUDANNA, Myron I. CYBULSKY a Sussan NOURSHARGH, 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* [online]. **7**(9), 678–689. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2156

- LI, Danyang a Minghua WU, 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **6**(1), 291. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00687-0
- LI, Lingbo, Yuzhen YANG, Zhen WANG a Fei Li GONG, 2002. Study of the effects of LPS on the TACE gene expression and its function. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* [online]. **22**(1). ISSN 0257716X. Dostupné z: doi:10.1007/bf02904774
- LINSLEY, P S a J A LEDBETTER, 1993. The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annual Review of Immunology* [online]. **11**(1), 191–212. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001203
- LIU, Christina H, Natalie D ABRAMS, Danielle M CARRICK, Preethi CHANDER, Johanna DWYER, Michelle R J HAMLET, Francesca MACCHIARINI, Mercy PRABHUDAS, Grace L SHEN, Pushpa TANDON a Merriline M VEDAMONY, 2017. Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. *Nature Immunology* [online]. **18**(11), 1175–1180. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3828
- MANAVALAN, Balachandran, Shaherin BASITH a Sangdun CHOI, 2011. Similar Structures but Different Roles – An Updated Perspective on TLR Structures. *Frontiers in Physiology* [online]. **2**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2011.00041
- MANTOV, Nikola, Mathilde ZROUNBA, Marion BROLLO, S GRASSIN-DELYLE, Matthieu GLORION, Mélanie DAVID, Emmanuel NALINE, Philippe DEVILLIER a Hélène SALVATOR, 2022. Ruxolitinib inhibits cytokine production by human lung macrophages without impairing phagocytic ability. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **13**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.896167
- MASS, Elvira, Falk NIMMERJAHN, Katrin KIERDORF a Andreas SCHLITZER, 2023. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews Immunology* [online]. **23**(9), 563–579. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/s41577-023-00848-y
- MATSUMOTO, Misako, Satomi KIKKAWA, Masayoshi KOHASE, Kensuke MIYAKE a Tsukasa SEYA, 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **293**(5). ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-291X(02)00380-7
- MAUEL, J. a V. DEFENDI, 1971. INFECTION AND TRANSFORMATION OF MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES BY SIMIAN VIRUS 40. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **134**(2), 335–350. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.134.2.335
- MEDZHITOV, Ruslan, 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* [online]. **449**(7164), 819–826. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature06246
- MEDZHITOV, Ruslan, 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* [online]. **454**(7203), 428–35. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature07201

- MENZEL, Alain, Hanen SAMOUDA, Francois DOHET, Suva LOAP, Mohammed S. ELLULU a Torsten BOHN, 2021. Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice—Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants* [online]. **10**(3), 414. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10030414
- MIYAKE, Kensuke, 2007. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology* [online]. **19**(1), 3–10 [vid. 2024-03-17]. ISSN 1044-5323. Dostupné z: doi:10.1016/J.SMIM.2006.12.002
- MIYAKE, Kensuke a Hajime KARASUYAMA, 2017. Emerging roles of basophils in allergic inflammation. *Allergy International* [online]. **66**(3), 382–391. ISSN 13238930. Dostupné z: doi:10.1016/j.alit.2017.04.007
- MOHAMMADI, Asadollah, Christopher N. BLESSO, George E. BARRETO, Maciej BANACH, Muhammed MAJEED a Amirhossein SAHEBKAR, 2019. Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. **66**, 1–16. ISSN 09552863. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnutbio.2018.12.005
- MONGUIÓ-TORTAJADA, Marta, Marcella FRANQUESA, Maria Rosa SARRIAS a Francesc E. BORRÀS, 2018. Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes article. *Cell Death and Disease* [online]. **9**(5). ISSN 20414889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-018-0520-2
- MOORS, Marlena A., Liwu LI a Steven B. MIZEL, 2001. Activation of Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase by Gram-Negative Flagellin. *Infection and Immunity* [online]. **69**(7), 4424–4429. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.69.7.4424-4429.2001
- MOSSER, David M. a Justin P. EDWARDS, 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* [online]. **8**(12), 958–969. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2448
- NETEA, Mihai G., Frank L. VAN DE VEERDONK, Jos W.M. VAN DER MEER, Charles A. DINARELLO a Leo A.B. JOOSTEN, 2015. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annual Review of Immunology* [online]. **33**(1), 49–77. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112306
- NICHOLSON, Lindsay B., 2016. The immune system. *Essays in Biochemistry* [online]. **60**(3), 275–301. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20160017
- NOLTE, Martijn A., Salomé LEIBUNDGUT-LANDMANN, Olivier JOFFRE a Caetano Reis e SOUSA, 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **204**(6), 1487–1501. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20070325
- ORTEGA-GÓMEZ, Almudena, Mauro PERRETTI a Oliver SOEHNLEIN, 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **5**(5), 661–674. ISSN 1757-4676. Dostupné z: doi:10.1002/emmm.201202382
- PAMIES, David, Anna BAL-PRICE, Christophe CHESNÉ, Sandra COECKE, Andras DINNYES, Chantra ESKES, Regina GRILLARI, Gerhard GSTRAUNTHALER, Thomas

- HARTUNG, Paul JENNINGS, Marcel LEIST, Ulrich MARTIN, Robert PASSIER, Jens C. SCHWAMBORN, Glyn N. STACEY, Heidrun ELLINGER-ZIEGELBAUER a Mardas DANESHIAN, 2018. Advanced Good Cell Culture Practice for Human Primary, Stem Cell-Derived and Organoid Models as well as Microphysiological Systems. *Altex* [online]. **35**(3). ISSN 18688551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.1710081
- PATENTE, Thiago A., Mariana P. PINHO, Aline A. OLIVEIRA, Gabriela C. M. EVANGELISTA, Patricia C. BERGAMI-SANTOS a José A. M. BARBUTO, 2019. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* [online]. **9**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.03176
- POLLARD, Jeffrey W., 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. **9**(4), 259–270. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2528
- PRAME KUMAR, Kathryn, Alyce J. NICHOLLS a Connie H. Y. WONG, 2018. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research* [online]. **371**(3), 551–565. ISSN 0302-766X. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-017-2753-2
- PRASAD, Sahdeo, Amit K TYAGI a Bharat B AGGARWAL, 2016. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* [online]. **241**(8), 783–799. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/1535370216638770
- QUERO, Lilian, Edveena HANSER, Tobias MANIGOLD, André N. TIADEN a Diego KYBURZ, 2017. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Research & Therapy* [online]. **19**(1), 245. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-017-1447-1
- ROE, Kevin, 2021. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. **93**(2). ISSN 13653083. Dostupné z: doi:10.1111/sji.12970
- ROSALES, Carlos, 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in Physiology* [online]. **9**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2018.00113
- ROSE-JOHN, Stefan, 2018. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **10**(2), a028415. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a028415
- ROSENBERG, Helene F., Kimberly D. DYER a Paul S. FOSTER, 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. **13**(1), 9–22. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3341
- SAITO, Suguru, Alato OKUNO, Duo Yao CAO, Zhenzi PENG, Hui Ya WU a Shu Hui LIN, 2020. Bacterial lipoteichoic acid attenuates toll-like receptor dependent dendritic cells activation and inflammatory responder. *Pathogens* [online]. **9**(10). ISSN 20760817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens9100825

SAKUMA, Chisato, Mitsuru SATO, Takato TAKENOUCI, Joe CHIBA a Hiroshi KITANI, 2012. Critical Roles of the WASP N-Terminal Domain and Btk in LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages. *PLoS ONE* [online]. **7**(1), e30351. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0030351

SAMEER, Aga Syed a Saniya NISSAR, 2021. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *BioMed Research International* [online]. **2021**, 1–14. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2021/1157023

SHEKARIAN, T., S. VALSESIA-WITTMANN, J. BRODY, M.C. MICHALLET, S. DEPIL, C. CAUX a A. MARABELLE, 2017. Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. *Annals of Oncology* [online]. **28**(8), 1756–1766. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdx179

SIEMIŃSKA, Izabela, Ewa POLJAŃSKA a Jarek BARAN, 2021. Granulocytes and Cells of Granulocyte Origin—The Relevant Players in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(7), 3801. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073801

SPANOU, Evagelia, Polyxeni KALISPERATI, Ioannis S. PATERAS, Alexandros PAPALAMPROS, Alexandra BARBOUTI, Athanasios G. TZIOUFAS, Athanassios KOTSINAS a Stavros SOUGIOULTZIS, 2017. Genetic Variability as a Regulator of TLR4 and NOD Signaling in Response to Bacterial Driven DNA Damage Response (DDR) and Inflammation: Focus on the Gastrointestinal (GI) Tract. *Frontiers in Genetics* [online]. **8**. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2017.00065

STEPHENS, Alexandre S, Sebastien R STEPHENS a Nigel A MORRISON, 2011. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Research Notes* [online]. **4**(1), 410. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-4-410

STEVENS, Maxwell T, Beatrice D NAGARIA, Warwick J BRITTON a Bernadette M SAUNDERS, 2021. Macrophages of different tissue origin exhibit distinct inflammatory responses to mycobacterial infection. *Immunology & Cell Biology* [online]. **99**(10), 1085–1092. ISSN 0818-9641. Dostupné z: doi:10.1111/imcb.12493

STOFFELS, Monique, Ruben ZAAL, Nina KOK, Jos W.M. VAN DER MEER, Charles A. DINARELLO a Anna SIMON, 2015. ATP-induced IL-1 β specific secretion: True under stringent conditions. *Frontiers in Immunology* [online]. **6**(FEB). ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00054

SUZUKI, Katsuhiko, 2019. Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. *Biomolecules* [online]. **9**(6), 223. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9060223

TADDIO, Marco F., Claudia A. CASTRO JARAMILLO, Peter RUNGE, Alain BLANC, Claudia KELLER, Zeynep TALIP, Martin BÉHÉ, Nicholas P. VANDER MEULEN, Cornelia HALIN, Roger SCHIBLI a Stefanie D. KRÄMER, 2021. In Vivo Imaging of Local Inflammation: Monitoring LPS-Induced CD80/CD86 Upregulation by PET. *Molecular*

Imaging and Biology [online]. **23**(2), 196–207. ISSN 1536-1632. Dostupné z: doi:10.1007/s11307-020-01543-3

TAKEUCHI, Osamu a Shizuo AKIRA, 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* [online]. **140**(6), 805–820. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

THELLIN, O., W. ZORZI, B. LAKAYE, B. DE BORMAN, B. COUMANS, G. HENNEN, T. GRISAR, A. IGOUT a E. HEINEN, 1999. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of Biotechnology* [online]. **75**(2–3). ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(99)00163-7

THORNBERRY, Nancy A., Herbert G. BULL, Jimmy R. CALAYCAY, Kevin T. CHAPMAN, Andrew D. HOWARD, Matthew J. KOSTURA, Douglas K. MILLER, Susan M. MOLINEAUX, Jeffrey R. WEIDNER, John AUNINS, Keith O. ELLISTON, Julia M. AYALA, Francesca J. CASANO, Jayne CHIN, Gloria J.-F. DING, Linda A. EGGER, Erin P. GAFFNEY, Guadalupe LIMJUCO, Oksana C. PALYHA, S. M. RAJU, Anna M. ROLANDO, J. Paul SALLEY, Ting-Ting YAMIN, Terry D. LEE, John E. SHIVELY, Malcolm MACCROSS, Richard A. MUMFORD, John A. SCHMIDT a Michael J. TOCCI, 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* [online]. **356**(6372), 768–774. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/356768a0

TODA, Gotaro, Toshimasa YAMAUCHI, Takashi KADOWAKI a Kohjiro UEKI, 2021. Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. *STAR Protocols* [online]. **2**(1). ISSN 26661667. Dostupné z: doi:10.1016/j.xpro.2020.100246

TRACY, R. P., 2006. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, c. A.D. 25). *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* [online]. **61**(10), 1051–1052. ISSN 1079-5006. Dostupné z: doi:10.1093/gerona/61.10.1051

VAN DER MERWE, P. Anton, Dale L. BODIAN, Susan DAENKE, Peter LINSLEY a Simon J. DAVIS, 1997. CD80 (B7-1) Binds Both CD28 and CTLA-4 with a Low Affinity and Very Fast Kinetics. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **185**(3), 393–404. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.185.3.393

WYNN, Thomas A. a Kevin M. VANNELLA, 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* [online]. **44**(3), 450–462. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015

YAMAMOTO, Masahiro, Shintaro SATO, Hiroaki HEMMI, Katsuaki HOSHINO, Tsuneyasu KAISHO, Hideki SANJO, Osamu TAKEUCHI, Masanaka SUGIYAMA, Masaru OKABE, Kiyoshi TAKEDA a Shizuo AKIRA, 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* [online]. **301**(5633). ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1087262

YAMAMOTO, Masahiro, Shintaro SATO, Kiyotoshi MORI, Katsuaki HOSHINO, Osamu TAKEUCHI, Kiyoshi TAKEDA a Shizuo AKIRA, 2002. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the

Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Immunology* [online]. **169**(12), 6668–6672. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.169.12.6668

YUMOTO, Hiromichi, Kouji HIRAO, Yuki HOSOKAWA, Hitomi KURAMOTO, Daisuke TAKEGAWA, Tadashi NAKANISHI a Takashi MATSUO, 2018. The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. *Japanese Dental Science Review* [online]. **54**(3), 105–117. ISSN 18827616. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdsr.2018.03.001

ZHANG, Haisong a Shao-Cong SUN, 2015. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience* [online]. **5**, 63. ISSN 2045-3701. Dostupné z: doi:10.1186/s13578-015-0056-4

ZHOU, Yujie, Songyan YU a Wenyong ZHANG, 2023. NOD-like Receptor Signaling Pathway in Gastrointestinal Inflammatory Diseases and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(19), 14511. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms241914511

ZINDEL, Joel a Paul KUBES, 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. **15**(1), 493–518. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847