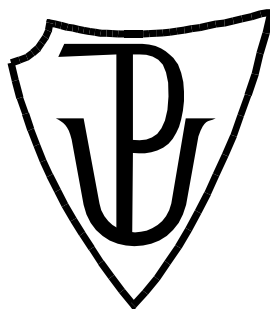


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Porovnání imunomodulační efektivity prezentace
exogenního antigenu v myších antigen
prezentujících buňkách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Gabriela Kořalková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Gabriela Kořalková
Název práce	Porovnání imunomodulační efektivity prezentace exogenního antigenu v myších antigen prezentujících buňkách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Cílem práce je vyhodnocení internalizace exogenního antigenu (p24-liposom) dendritickou buňkou. Práce je zaměřena na porovnání efektivity vyvolané imunitní odpovědi u dendritických buněk čerstvě izolovaných a zmražených, pocházejících z monocytů kostní dřeně myši. Je hodnocena také kapacita aktivace dendritických buněk. Pomocí spektrálního cytometru byla měřena četnost povrchových markerů na dendritických buňkách, specifických pro určité imunitní reakce. Porovnáním schopnosti buněk exprimovat tyto povrchové markery bylo zjištěno, že zmražené dendritické buňky nejsou schopny vyvolat tak efektivní imunitní odpověď jako buňky čerstvě izolované. Dále byla vyhodnocena způsobilost dendritických buněk k internalizaci antigenu pomocí konfokální mikroskopie, kde jsme se zaměřili na vizualizaci buněčných částí. Bylo zjištěno, že již po hodině pulzace antigenem jsou dendritické buňky čerstvě izolované schopny utvořit dostatečně vyvinutý endosom, díky kterému by byl pohlcený antigen dále zpracován.

Klíčová slova	Dendritická buňka, zkřížená prezentace, povrchové markery, exogenní antigen, p24 protein, liposom
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Gabriela Kořalková
Title	Comparison of immunomodulation efficacy of exogenous antigen presentation in murine antigen presenting cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The aim of this work is to evaluate the internalization of exogenous antigen (p24-liposome) by dendritic cells. This work is focused on comparison of immune response effectivity in freshly isolated and frozen dendritic cells derived from the murine bone marrow monocytes. It was also evaluated the dendritic cells activation capacity. The frequency of surface markers on dendritic cells specific for certain immune responses was measured using a spectral cytometer. The ability of cells to express these surface markers was compared and it was found that the frozen ones are not able to induce as effective immune response as the freshly isolated dendritic cells. Furthermore, the ability of dendritic cells to internalize antigen was evaluated by confocal microscopy, where we focused on the visualization of cell parts. It was evaluated that the freshly isolated dendritic cells were able to form a sufficiently developed endosome which is necessary for antigen internalization already after one hour of antigen pulsation.</p>
Keywords	dendritic cell, cross presentation, surface markers, exogenous antigen, p24 protein, liposome
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Souhrnný přehled možností prezentace antigenu	2
2.1.1 Histokompatibilní systém	2
2.1.1.1 Prezentace antigenu	2
2.1.1.2 MHC I	2
2.1.1.3 MHC II	5
2.1.1.4 Zkřížená prezentace	12
2.2 Charakterizace p24 (HIV) proteinu	16
2.3 Liposomy	18
2.4 Změna morfologie buněk z monocytů na dendritické buňky	20
2.5 Přehled a funkce aktivačních markerů DC - CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86	21
2.6 Spektrální průtoková cytometrie	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Materiál a metody	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Laboratorní vybavení	25
3.1.3 Metody	25
3.1.3.1 Založení knihovny fluorochromy značených protilátek pro spektrální cytometrii	25
3.1.3.2 Příprava dendritických buněk z kostní dřeně	26
3.1.3.3 Charakterizace diferenciovaných buněk spektrální cytometrií	27
3.1.3.4 Analýza pomocí konfokální mikroskopie	30
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1 Spektrální cytometrie	32
4.2 Snímky z konfokální mikroskopie	37
4.3 Diskuze	39
5 ZÁVĚR	40
6 LITERATURA	41
7 SEZNAM ZKRATEK	44

Cíle práce

Cílem teoretické části práce je vypracování rešerše zahrnující následující témata:

- Souhrnný přehled možností prezentace antigenu - MHC I, MHC II, zkřížená - prezentace.
- Charakterizace p24 (HIV) proteinu.
- Změny morfologie buněk z monocytů na DC.
- Přehled a funkce aktivačních markerů DC - CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86.

Praktická část je zaměřena na porovnání imunomodulační efektivity čerstvě izolovaných a zamražených dendritických buněk, diferencovaných z monocytů kostní dřeně myši (BDMC). Mezi cíle praktické části patří:

- izolace monocytů z femurů BALB/c myši.
- diferenciaci v prostředí GM-CSF a IL-4.
- hodnocení diferenciaci pomocí světelného mikroskopu a CD11c markeru (FC).
- pulsování čerstvých a zamražených DC antigenem p24 (HIV).
- vyhodnocení internalizace antigenu pomocí spektrální cytometrie po 24 hodinách.
- vyhodnocení internalizace antigenu pomocí fluorescenční (konfokální) mikroskopie po 1,2 a 4 hodinách.
- zpracování získaných dat v programech FlowJo, ImageJ, GraphPad.

1 ÚVOD

Dendritické buňky (DC) zprostředkovávají spojení mezi vrozenou a získanou imunitní odpovědí. Využívají se z monocyty, což jsou jednojaderné buňky vznikající v kostní dřeni. Dendritické buňky jsou významné tím, že jsou schopny produkovat jak molekuly MHC I, tak MHC II. MHC glykoproteiny se svou vazbou na antigenní částice podílí na vyvolání imunitní odpovědi. MHC I molekula je přítomna ve všech jaderných buňkách organismu a uplatňuje se při setkání buňky s endogenním antigenem, tím může být chybně složený protein nebo nádorová buňka. Vazbou MHC I glykoproteinu na antigen je vyvolána cytotoxická imunitní odpověď, prostřednictvím CD8⁺ T-lymfocytů. Molekuly MHC II se vyskytují pouze u buněk zprostředkujících antigen a reagují na antigeny exogenní (virus, bakterie). Vazbou MHC II na antigen je vyvolána tvorba protilátek, nebo aktivace makrofágů, na této reakci se podílí CD4⁺ T-lymfocyty.

Bylo zjištěno, že DC jsou schopny tzv. zkřížené prezentace antigenu. Zkříženou prezentací nazýváme jev, kdy je exogenní antigen navázán na molekulu MHC I a dochází k vyvolání cytotoxické buněčné odpovědi. Tato práce zahrnuje zhodnocení kapacity aktivace DC použitým antigenem.

V této práci byl jako antigen použit p24 protein, což je hlavní složka kapsidy HIV viru. Jelikož je však samostatný p24 protein DC špatně rozpoznáván, byla využita vazba tohoto proteinu na liposom. Liposom prochází do DC prostřednictvím povrchových receptorů a je vnímán jako antigen. Díky tomu by měla být zajištěna internalizace navázaného antigenu p24 a aktivace DC. Zvýšení kapacity aktivace DC vazbou antigenu p24 na liposom a tím podpoření zkřížené prezentace a vyvolání cytotoxické buněčné odpovědi by mohlo být dále využito při tvorbě vakcín proti HIV.

Práce zahrnující izolaci a diferenciaci monocytů je časově poměrně náročná. V praxi se setkáváme s tím, že se v rámci časové úspory izolované monocyty zmrazí a jsou uchovány pro další využití. V případě diferenciaci těchto monocytů na DC a následné pulzaci těchto DC antigenem, byly pozorovány rozličné míry exprese některých povrchových markerů, podílejících se na vyvolání imunitní odpovědi, než u DC pocházejících z čerstvě izolovaných monocytů. Jedním z cílů této práce je proto porovnání exprese povrchových markerů u DC čerstvě izolovaných a zmražených a zhodnocení vhodnosti zmražených monocytů pro tato měření.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Souhrnný přehled možností prezentace antigenu

2.1.1 Histokompatibilní systém

Imunitní systém zahrnuje nespočetné množství mechanismů, které organismu zajišťují rozpoznání a zničení potencionálně nebezpečných látek, antigenů. Imunitní systém má za úkol zpracovat širokou paletu signálů z vnějšího i vnitřního prostředí. Prezentace antigenu pomocí MHC (Major Histocompatibility komplex) má zásadní význam jak pro buněčnou, tak pro humorální imunitní odpověď. Molekuly MHC totiž umožňují T-lymfocytům rozpoznat konkrétní antigeny (Zachova *et al.*, 2016).

2.1.1.1 Prezentace antigenu

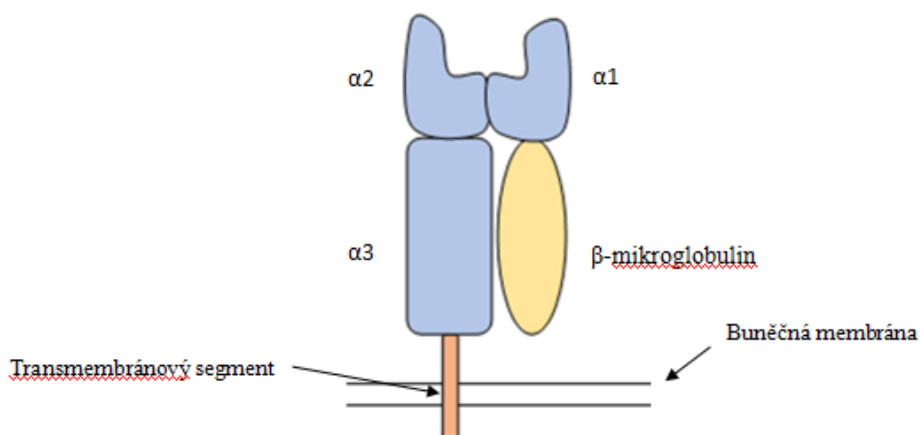
MHC zahrnuje glykoproteiny 1. a 2. třídy. Glykoproteiny 1. třídy (MHC gp 1), se vyskytují ve všech jaderných buňkách organismu. Glykoproteiny 2. třídy (MHC gp 2), jsou přítomny pouze v buňkách prezentujících antigen (APC). Mezi APC patří dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B-lymfocyty. Mezi společné vlastnosti buněk APC patří především fagocytosa. Po reakci antigenu s APC, buňka štěpí antigen na antigenní fragmenty, tyto fragmenty jsou vázány glykoproteiny MHC a jsou vystaveny na povrchu buňky tak, aby byly dobře rozpoznatelné pro T-lymfocyty (Hořejší *et al.*, 2017).

2.1.1.2 MHC I

MHC gp I molekuly (Obr. 1) se skládají z transmembránového řetězce α , u kterého rozlišujeme tři domény. N-terminální domény $\alpha 1$ a $\alpha 2$, které tvoří vazebná místa pro peptidy, doména $\alpha 3$ a nekovalentně vázaný řetězec $\beta 2$ -mikroglobulinu ($\beta 2m$ doména), mají stavbu podobnou imunoglobulinovým jednotkám (Chen *et al.*, 2020).

Základní funkcí MHC I glykoproteinu je vázat peptidové fragmenty produkované buňkou a vystavovat je na buněčném povrchu. Buňka vystavuje na svém povrchu všechny proteiny, které vyprodukovala. Pokud jsou všechny tyto vystavené proteiny fyziologické, buňka signalizuje imunitnímu systému, že je zdravá. Vystavením antigenního peptidu je naopak upozorněno, že je něco v nepořádku. K vazbě molekuly MHC I na antigenní peptid dochází v případě, že buňka reaguje na antigen endogenního původu, například tumorového nebo virového. Antigen můžeme označit jako endogenní v případě, že se nachází volně v cytosolu buňky. Tento mechanismus vede ke specifické

eliminaci virem infikovaných, nebo tumorových buněk pomocí cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů. T-lymfocyty jsou schopny rozeznat komplex MHC I-fragment pomocí antigeně specifických receptorů (TcR). MHC I imunitní odpověď je nezbytná také pro tvorbu paměťových CD8⁺ T-lymfocytů (Krejsek *et al.*, 2016).



Obrázek 1.: Zjednodušená struktura MHC I glykoproteinu vázaného na povrchu buňky

Vazba peptidů na MHC gp I

Štěpení antigenů na peptidové fragmenty je umožněno díky proteasomům. Proteasomy jsou proteinové komplexy, které zajišťují kromě štěpení antigenů fyziologické odstranění buněčných proteinů. Proteiny určené k rozložení, bývají označeny připojením několika molekul polypeptidu ubikvitinu. Jednou z dalších možností nasměrování molekuly antigenu do proteasomu, je navázání na cytoplazmatickou bílkovinu TRIM21 (Tripartite Motif-containing protein 21). K navázání této bílkoviny dochází po opsonizaci virů imunoglobuliny G nebo M. TRIM21 se označuje jako poslední linie obrany proti virům, která zachytává viry pokryté protilátkami. Je schopen vyvolat kaskádu dějů, které vedou k zabránění replikace viru a k vyvolání antivirového buněčného stavu (Foss *et al.*, 2019).

Působením Interferonu γ , který je produkován aktivovanými T-lymfocyty, se proteasom může vyvíjet v imunoproteasom. Imunoproteasomy se hojně vyskytují v cytoplazmě dendritických buněk a mají schopnost štěpit jak antigenní peptidy, tak molekuly označené ubikvitinem. Imunoproteasomy umožňují efektivnější proteolytické štěpení antigenních peptidů (Tanaka K., 1994).

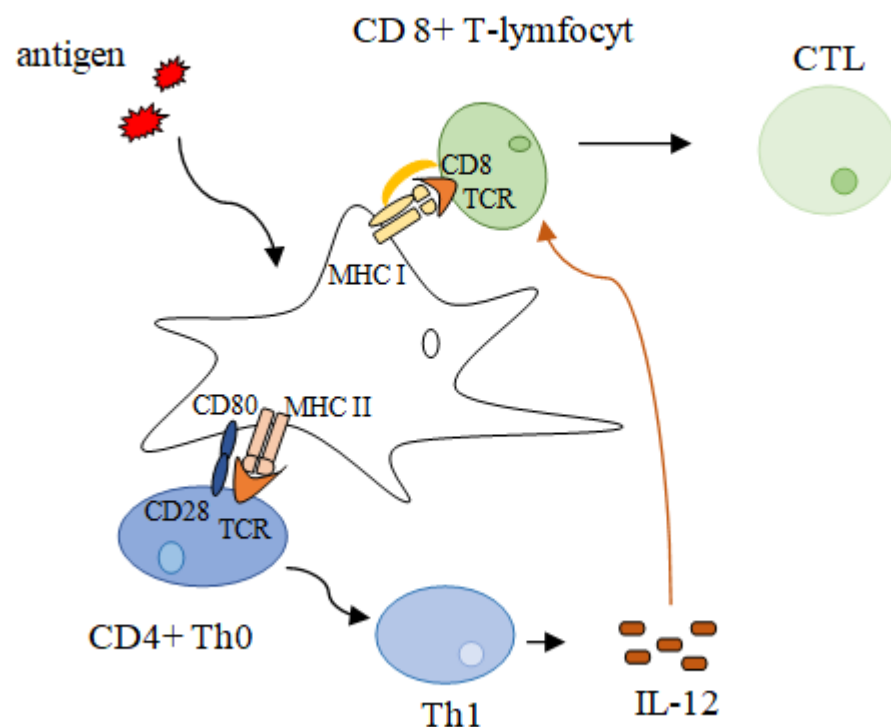
Peptidové fragmenty, určené k MHC I prezentaci mohou být syntetizovány v cytosolu buňky, nebo jsou dopraveny z endoplazmatického retikula. Délka fragmentů určená k vazbě na MHC I glykoproteiny je zpravidla 8-10 aminokyselin (Rock a Shen, 2005). Peptidové řetězce vzniklé v proteasomu dále putují do endoplazmatického retikula (ER). Tento přesun je uskutečněn díky proteinovému komplexu TAP (Transporter associated with antigen processing), který se nachází na membráně ER. V některých případech může docházet k transportu řetězců podstatně delších než 8-10 aminokyselin, tyto řetězce jsou štěpeny endoplazmatickými aminoproteasomy ERAP 1 a ERAP 2. K navázání peptidového fragmentu vhodné délky na molekulu MHC I dochází v ER, kde je také molekula MHC I glykoproteinu syntetizována. Molekuly MHC I mohou být také recyklovány z buněčného povrchu, i v tomto případě jsou transportovány zpět do endosomu. V endosomu dochází k výměně původního navázaného antigenního fragmentu za antigenní fragment nově vzniklý (Gromme *et al.*, 1999).

Na ribozomech ER vzniká α řetězec MHC I, ten je zabudován do membrány a stabilizován pomocí chaperonů - kalnexinu a thiolové oxidoreduktasy. Po navázání řetězce β 2m následuje konformační úprava chaperony - kalretikulinem a tapasinem, celý vzniklý komplex je napojen na TAP receptor, kde je udržován ve stavu schopném reagovat na odpovídající antigenní peptid (Gromme *et al.*, 1999).

Vyvolání imunitní odpovědi je regulováno silou vazby antigenního peptidu s molekulou MHC I, pouze pokud je vazba dostatečně silná, dochází k efektivní imunitní odpovědi. Efektivní imunitní odpověď zahrnuje oddělení komplexu MHC I-antigenní peptid a přesun přes Golgiho aparát na buněčný povrch. Přesun je umožněn vesikulárním transportem. Na vystavený komplex MHC I-antigenní peptid reagují $CD8^+$ T-lymfocyty, které se podílí na cytotoxických mechanismech, vyvolávajících apoptosu cílové buňky. Vyvolání apoptosy začíná vazbou TcR receptotu T-lymfocytu na komplex MHC I-antigenní fragment vystavený na povrchu buňky APC. Pro tuto vazbu je zásadní také vazba koreceptoru CD8 přítomného na T-lymfocytu na molekulu MHC I. Kontaktem APC s T-lymfocyttem dochází ke zrání $CD8^+$ T-lymfocytu a vzniká funkční cytotoxický T-lymfocyt (CTL) (Laugel *at al.*, 2011).

Při prvotním setkání $CD8^+$ lymfocytu s prezentovanou molekulou antigenu je nutná také přítomnost $CD4^+$ T-lymfocytu. Kdy nejdříve dochází k navázání $CD4^+$ T-lymfocytu na buňku APC, k jeho diferenciaci a k uvolnění cytokinů. Pro zajištění diferenciaci $CD4^+$ T-lymfocytu jsou důležité vazby TcR-MHC II a CD28-CD80.

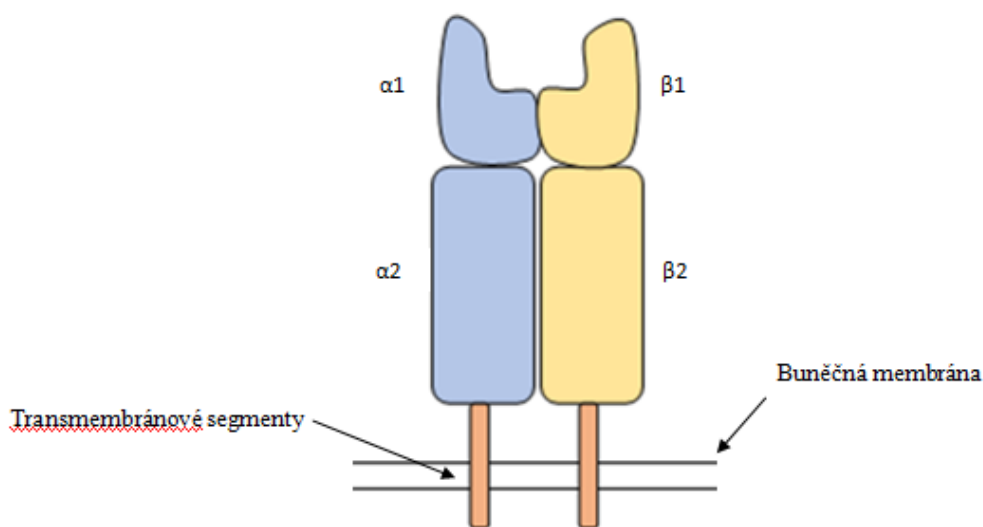
Uvolněné cytokiny se poté podílí na vyvolání diferenciace $CD8^+$ T-lymfocyту na CTL (Obr. 2). Po tomto setkání se již $CD8^+$ T-lymfocyt stává paměťovým, a účast $CD4^+$ T-lymfocytů při reakci na tento antigen už není potřeba. CTL se podílí na uvolňování cytotoxických a antimikrobiálních látek, také indukují tvorbu edému a granulocytární infiltraci. K eliminaci cílových buněk bývá nejčastěji použit Perforin, nebo Granulosin, mezi cytotoxické látky patří také například Grazym K (Hoyer *et al.*, 2014).



Obrázek 2.: Schéma aktivace a diferenciace $CD8^+$ T-lymfocyту, vznik CTL

2.1.1.3 MHC II

MHC glykoproteiny II. třídy (Obr. 3) se skládají ze dvou řetězců α a β , mezi nimiž je vazba nekovalentní. Strukturní podjednotky $\alpha 1$ a $\beta 1$ tvoří vazebné místo pro peptidové fragmenty. Na rozdíl od vazebného místa MHC I molekul je na obou koncích otevřené, proto dochází k vazbě peptidů dlouhých zhruba 15-35 aminokyselin. K vazbě MHC II glykoproteinu na antigenní fragment dochází při setkání organismu v exogenním antigenem (Brown *et al.*, 2015).



Obrázek 3.: Zjednodušená struktura MHC II glykoproteinů vázaného na povrchu buňky

Vazba peptidu na molekulu MHC II

Obě třídy MHC glykoproteinů jsou po syntéze v ER transportovány přes Golgiho aparát na buněčný povrch. V případě MHC I, dochází k transportu vzniklého komplexu MHC I-antigenního peptidu. V případě MHC II je transportována molekula glykoproteinu s navázaným invariantním řetězcem Ii (Chen *et al.*, 2020).

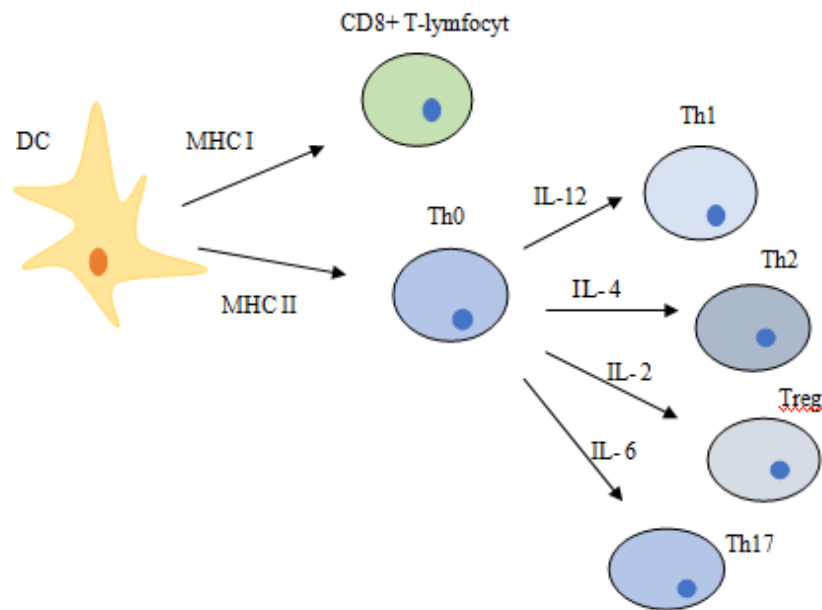
Řetězce molekuly MHC II α a β jsou syntetizovány v ER. Tvoří komplexní částici spolu s invariantním polypeptidovým řetězcem (Ii). Utvořený komplex je transportován přes Golgiho aparát pomocí vesikulárního transportu. Vesikuly zprostředkující tento transport se označují jako MICC a mají charakteristické vlastnosti, jak vesikulární, tak lysosomální. V MICC dochází k rozštěpení polypeptidového řetězce Ii na kratší fragmenty. Nejvýznamnější funkci má fragment nazývaný se CLIP (class II associated invariant peptide), který vyplňuje vazebné místo pro antigenní peptid, dokud není tímto antigenním peptidem nahrazen (Romagnoli a Germain, 1994).

Exogenní antigen může vstupovat do buňky APC endocytosou zprostředkovanou receptorem – důležitou roli zde hraje protein klatrin, který se vyskytuje na vnitřní straně buněčné membrány. Postupně dochází k invaginaci cytoplazmatické membrány a tvorbě časného endosomu, jehož povrch je kryt klatrinem. Časný endosom ztrácí povrchové molekuly typické pro plazmatickou membránu a zraje v multivezikulární tělísko (Zachova *et al.*, 2016).

Můžeme se setkat i s prostoupením exogenního antigenu pomocí fagocytosy nebo pinocytosy. Pinocytosa je založena na prostupování extracelulární tekutiny a látek v ní rozpuštěných. V případě fagocytosy buňka tvoří paožky a dochází k aktivnímu pohlcení pevných částic (Junqueira a Carneiro, 2005). Vesikulární útvary vzniklé pinocytosou nebo fagocytosou, označujeme jako časné fagosomy. Multivesikulární tělíska i časné fagosomy prostupují hlouběji do buňky, kde dochází k jejich fúzi s lysosomy, čímž vznikají fagolysosomy, obsahující hydrolytické enzymy. U některých fagosomů může docházet k výměně obsahu s časnými endosomy už přítomnými v buňce. Teprve ve fagolysosomu tedy dochází ke štěpení antigenního peptidu na fragmenty. V rámci buňky APC se setkávají fagolysosomy s endosomy obsahujícími molekuly MHC II, dochází k jejich navázání a k přesunutí komplexu MHC II - fragment na buněčný povrch (Zachova *et al.*, 2016). Komplex MHC II – fragment aktivuje $CD4^+$ T-lymfocyty, které se množí a produkují cytokiny stimulující buď fagocytosu antigenní molekuly, nebo stimulaci B-lymfocytu k tvorbě specifických protilátek. Kontakt mezi naivním T-lymfocylem a APC musí trvat delší dobu, během které reaguje s vystaveným komplexem MHC II – peptid několik TcR receptorů lymfocytu. Tato doba je nutná pro vytvoření dostatečného množství signalizačních molekul, které jsou schopné vyvolat proliferaci a diferenciaci T-lymfocytu. Při styku komplexu MHC II-peptid se zralým, nebo paměťovým T-lymfocylem, stačí mnohem kratší kontakt (Lu *et al.*, 2020).

Po aktivaci dendritických buněk – vystavení MHC II-peptid komplexu na buněčný povrch, stoupá produkce cytokinů a kostimulačních molekul. Kombinace receptorů aktivovaných daných antigenem a přítomné kostimulační molekuly uvolněné z dalších buněk přirozené imunity rozhodují o tom, které cytokiny bude DC exprimovat. (Hořejší *et al.*, 2017).

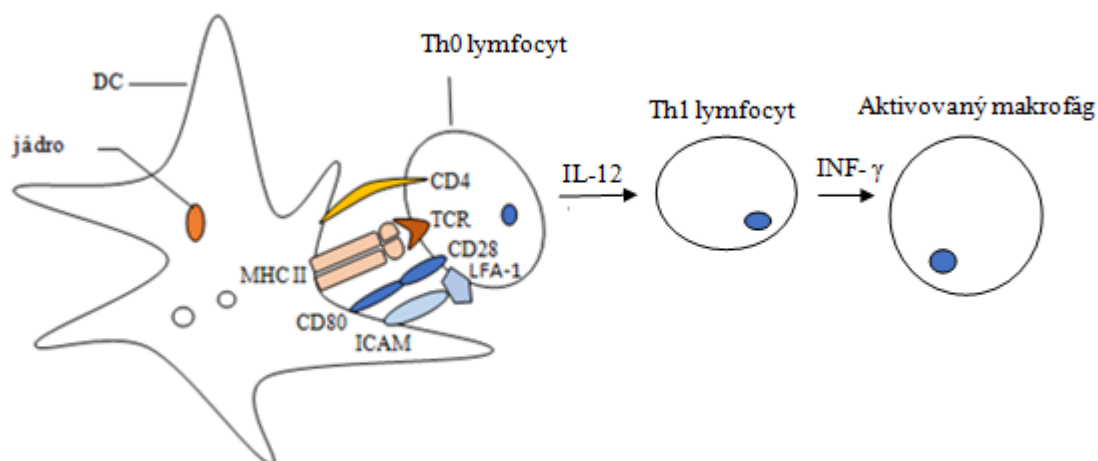
Fragment vázaný na glykoprotein MHC II je zachytáván $CD4^+$ T-lymfocylem (Th0), které zodpovídají za vyvolání specifické imunitní odpovědi. Podle cytokinů, uvolňovaných z okolních imunitních buněk a podle cytokinů které produkují $CD4^+$ T-lymfocyty samotné, je můžeme rozlišovat na Th1 a Th2 typ. Mezi $CD4^+$ T-lymfocyty se řadí také regulační T-lymfocyty a Th17 lymfocyty (Obr. 4.) (Wang *et al.*, 2016).



Obrázek 4.: Schéma znázorňující interakci DC s T-lymfocyty v závislosti na vazbě antigenu s MHC I, MHC II glykoproteiny a vliv Interleukinů na diferenciaci Th0

Th1 lymfocyty

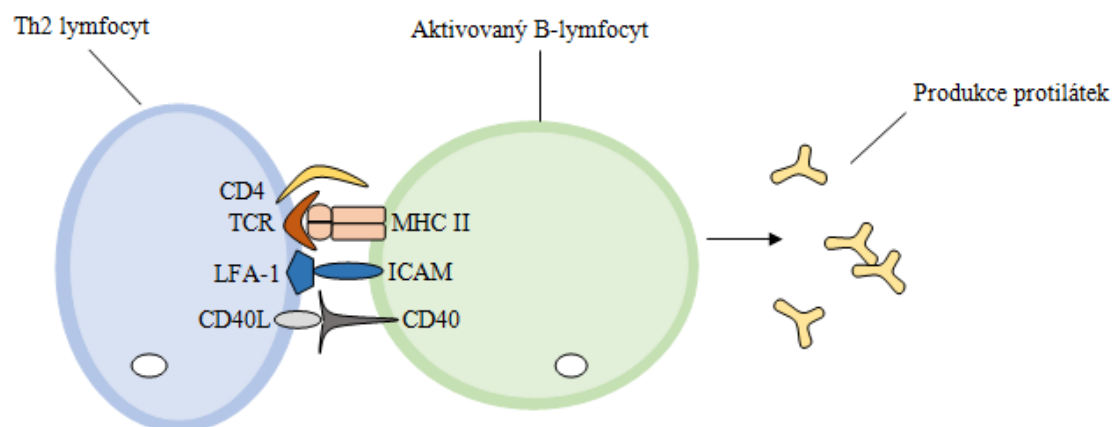
Th1 lymfocyty produkují Interleukin 2 (IL-2) a interferon γ (INF- γ). Pro vyvolání Th1 typu imunitní odpovědi, musí dendritická buňka po aktivaci svých receptorů produkovat IL-12, který funguje jako důležitý stimulační faktor pro aktivaci makrofágů. Tvorba IL-12 je vyvolána vazbou mezi povrchovou molekulou aktivovaného makrofágu CD40 a povrchovým receptorem aktivovaného Th1 CD40L. CD40L má také stimulační účinek pro zvýšení exprese povrchových molekul CD80, CD86 a ICAM na DC (Obr. 5). Zvýšená exprese těchto molekul, vede k větší vazebné kapacitě DC a k expresi INF- γ . INF- γ vyvolává diferenciaci infikovaného makrofágu na aktivovaný makrofág. Jednou z dalších interakcí podílejících se na vzniku imunologické synapse, je vazba mezi povrchovou molekulou Th lymfocytu - LFA-1 a povrchovou molekulou dendritické buňky ICAM. K aktivaci Th lymfocytu je nutný vznik plné imunologické synapse, na té se podílí také MHC molekuly, které se váží na TCR receptor Th lymfocytu, dále je nutná přítomnost CD4 receptoru na Th lymfocytu. Th1 typ imunitní odpovědi se uplatňuje při setkání organismu s intracelulárními parazity, jako jsou bakterie a viry (Cella *et al.*, 1996).



Obrázek 5.: Znáznornění vazby mezi aktivovanou DC a Th0 lymfocyt, vliv cytokinů na diferenciaci v makrofág

Th2 lymfocyty

Th2 jsou schopny produkce cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13, které se specializují na extracelulární parazity. Na imunitní odpovědi Th2 typu se podílejí jak dendritické buňky, tak bazofily, eozinofily a žírné buňky. Pro vývoj Th2 lymfocytu z prekursorového Th lymfocytu je důležitá přítomnost IL-4. Předpokládá se, že IL-4 pochází hlavně z bazofilů a žírných buněk. Na reakci se podílí také aktivační markery CD80 a CD86, které vyvolávají mnohonásobné dělení a diferenciaci Th lymfocytu na Th2 lymfocyt. Pro aktivaci B-lymfocytu a vyvolání tvorby protilátek je důležitá vazba povrchových molekul B-lymfocytu CD40 s CD40L markery aktinového Th lymfocytu (Obr 6). Současné studie se zaměřují na cílené dodání CD40L Th lymfocyty, tím by došlo k podpoření pouze specifické imunitní odpovědi na daný patogen. Molekuly CD40L jsou uloženy ve všech Th buňkách, kromě Treg. Po aktivaci TCR receptoru jsou mobilizovány a transportovány na buněčný povrch, to souvisí s aktivací B-lymfocytu. K tomu aby byla molekula CD40L stimulována de novo, by byla zapotřebí delší interakce Th lymfocytu s buňkou APC. Na aktivaci B lymfocytu se podílí také vazby mezi dalšími povrchovými molekuly Th2 lymfocytu a B lymfocytu CD4, TCR – MHC II a LFA-1 – ICAM (Gardell a Parker, 2017).



Obrázek 6.: Znázornění vazebných molekul mezi Th2-lymfocytem a B-lymfocytem, podílejících se na aktivaci B-lymfocytu

Regulační T-lymfocyty

Treg jsou díky mnoha svým imunosupresivním mechanismům schopny inhibovat buňky vrozené imunity, APC a také adaptivní B-lymfocyty, CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty. Jsou charakterizovány markery CD25 a CD4, jako jejich transkripční faktor byl identifikován Forkhead Box P3 (Foxp3) (Sánchez-Fueyo *et al.*, 2019). Buňky pozitivní na Foxp3 můžeme podle ontogenetického vývoje rozdělit do dvou skupin a to Treg pocházející z buněk thymu – tTreg a Treg pocházející z periferií pTreg. V thymu se Treg vyvíjí z CD4⁺ thymocytů, které získávají TCR receptor, umožňující interakci s MHC II molekulami. Treg vznikající v periferních tkáních se vyvíjí z nezralých konvenčních CD4⁺ T-buněk, které se diferencují v prostředí cytokinů indukujících Foxp3. Mezi tyto cytokiny spadá hlavně IL-2, transforming growth factor (TGF)- β , stejné účinky má také kyselina retinová – součást potravy, nebo léčiva jako glukokortikoidy a rapamycin. Funkce Treg je velice důležitá pro regulaci imunitních odpovědí – zachování imunitní homeostázy (Attias *et al.*, 2019).

Th17 lymfocyty

Typickým znakem pro Th17 lymfocyty je produkce IL-17, ten se podílí na vyvolání zánětlivé reakce v mnoha tkáních. Bylo zjištěno, že k vývoji Th17 dochází v případě nutnosti obrany organismu proti některým houbám a extracelulárním bakteriím, proti kterým jsou mechanismy Th1 a Th2 neúčinné. Exprese IL-17 má za následek produkci dalších zánětlivých cytokinů a aktivaci leukocytů, zejména neutrofilů – nastává

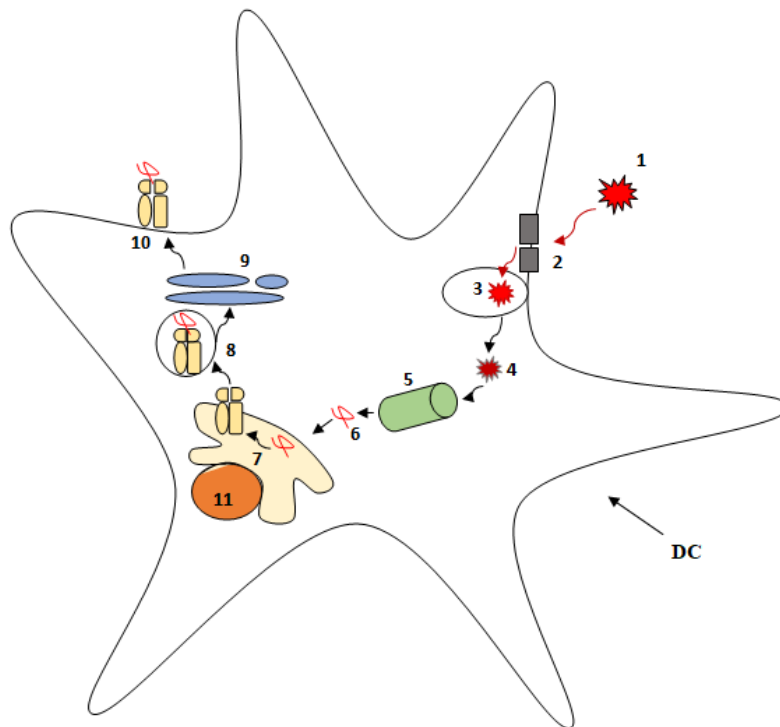
propojení mezi vrozenou a získanou imunitní odpovědí. Lymfocyty Th17 jsou také označovány jako hlavní mediátory patogeneze u některých autoimunitních a zánětlivých chorob. Nedávné studie naznačují, že produkce IL-17 u paměťových T buněk je vyvolána IL-23, tento typ stimulace je však možný pouze u již aktivovaných T-buněk. Diferenciace naivních T-lymfocytů je pod kontrolou TGF- β (transforming growth factor- β) a IL-6. V přítomnosti IL-6 a TGF- β lze diferenciaci T-lymfocytů podpořit přidáním TNF- α a IL-1. Je známo, že TGF- β působí jako inhibitor většiny T-lymfocytů a indukuje diferenciaci Treg lymfocytů, exprimujících protein Foxp3. TGF- β má tedy na starost regulaci mezi zánětlivou (indukce T-lymfocytů) a protizánětlivou (diferenciace Th17) buněčnou odpovědí (Tesmer *et al.*, 2008).

2.1.1.4 Zkřížená prezentace

Je známo, že na některé antigeny s exogenním původem reagují kromě CD4+ T-lymfocytů i CD8+ T-lymfocyty. Toto zprostředkování MHC I prezentace exogenního antigenu umožňují dendritické buňky a pravděpodobně i makrofágy. Dendritické buňky jsou schopny aktivovat CD8+ T-lymfocyty, ty se poté stávají buňkami antigeně specifickými (Delemarre *et al.*, 2001). K uskutečnění zkřížené prezentace prostřednictvím DC je nutná přítomnost povrchových molekul jako jsou lektin, CD40, langerin, nebo manosový receptor. Po navázání antigenu na specifický receptor probíhá receptorem zprostředkovaná endocytosa, následuje translokace pohlceného antigenu do cytosolu pomocí Sec61 přenašeče. Tím se antigen stává součástí MHC I prezentační dráhy a pokračuje do proteasomu, kde je štěpen na krátké peptidy. Odtud putuje do endoplasmatického retikula prostřednictvím TAP membránového transportéru (Wang *et al.*, 2016).

Cesta endosom – cytosol

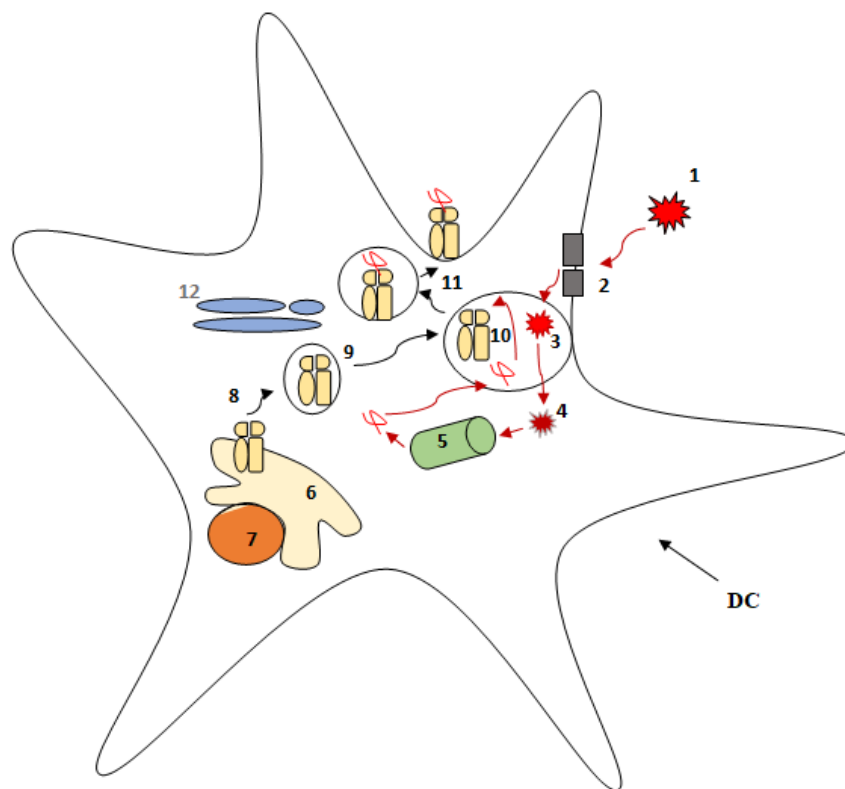
Po pohlcení antigenu buňkou APC dochází k fúzi vezikuly obsahující antigen s časným endosomem. Antigen opouští endosom a je transportován do cytosolu. V proteasomu pak dochází k jeho fragmentaci na kratší peptidový řetězec (8-10 aminokyselin). Takto vzniklý fragment je dopraven do ER, kde dochází k vazbě na molekulu MHC I glykoproteinu. Vzniklý komplex poté putuje přes Golgiho aparát na buněčný povrch. Existenci cesty endosom-cytosol dokazuje experiment, kdy při styku dendritických buněk s inhibitory proteasomů byla zkřížená prezentace zablokována. Také dendritické buňky mající knock-out TAP receptorů, které zprostředkovávají přesun antigenních fragmentů do ER, nejsou schopny zkřížené prezentace antigenu (Delemarre *et al.*, 2005).



Obrázek 7.: Průběh zkřížené prezentace DC – cesta endosom-cytosol. 1. vstupující molekula antigenu, 2. membránový receptor, 3. antigen transportován do časného endosomu, 4. antigen vystupuje z časného endosomu do cytosolu a stává se „endogenním“, 5. antigen je štěpen v proteasomu, 6. antigenní fragment, 7. antigenní fragment vstupuje do ER a váže se na molekulu MHC I, vzniklou v ER, 8. komplex MHC I – antigenní fragment uzavřený ve vezikule, 9. cesta přes Golgiho aparát, 10. vystavení komplexu MHC I – antigenní fragment na buněčný povrch, 11. buněčné jádro

Cesta endosom – cytosol – endosom

Antigen je pohlcen buňkou APC a dochází ke vzniku endosomální vezikuly, ta fúzuje s časným endosomem. Antigen se dostává přes transferový receptor endosomu (Sec61) do cytosolu, odkud putuje do proteasomu, kde je štěpen na peptidové fragmenty. Vzniklé fragmenty putují vezikulárním transportem z proteasomu zpět do endosomu, obsahujícího společně s antigenními fragmenty také molekuly MHC I dopravené z ER. Do endosomu byli společně s antigenními fragmenty transportovány také molekuly MHC Iz ER. Tato cesta je tedy označována jako proteasom závislá, bývá označována také jako retrogradní cesta (Rock a Shen, 2005).

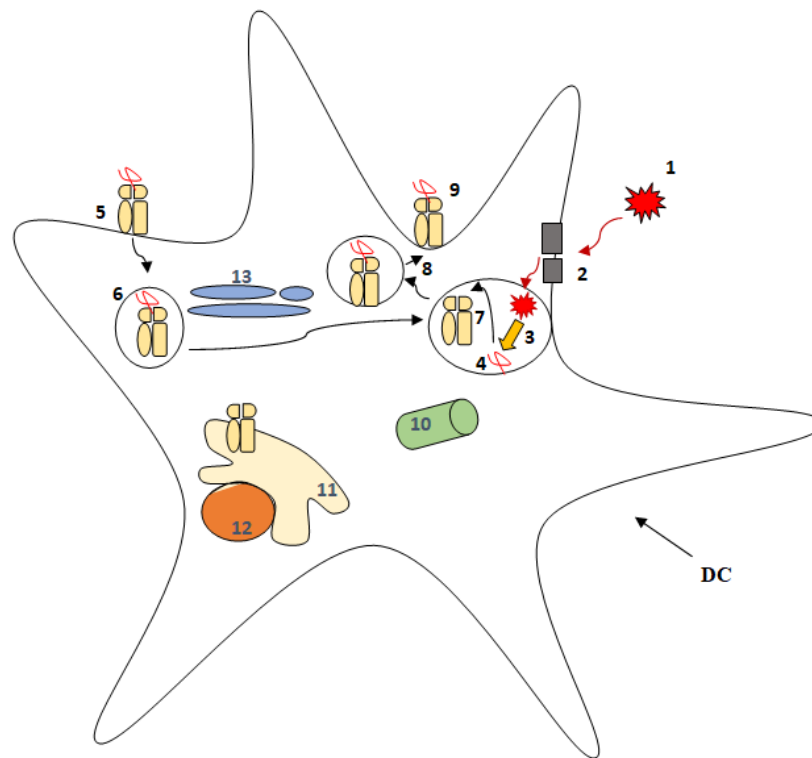


Obrázek 8.: Průběh zkřížené prezentace DC – cesta endosom-cytosol-endosom. 1. vstupující molekula antigenu, 2. membránový receptor, 3. antigen transportován do časného endosomu, odkud vystupuje do cytosolu, čímž se stává „endogenním“ 4. štěpení antigenu v proteasomu, vznik antigenního fragmentu, který putuje zpět do endosomu 6. endoplasmatické retikulum, 7. jádro 8. V ER vzniklý MHC I glykoprotein, 9. vakuolární transport komplexu MHC I do endosomu, 10. Navázání peptidového fragmentu na MHC I, 11. vakuolární transport komplexu MHC I-antigen a jeho vystavení na buněčný povrch, 12. Golgiho aparát- nezapojen do této cesty

Vakuolární cesta

Po transportu antigenu do buňky APC a fúzi s časným endosomem dochází ke štěpení antigenní molekuly pro tuto cestu specifickým enzymem cathepsinem S, který je v endosomu přítomen. MHC I molekula je v tomto případě recyklována z buněčného povrchu a transportována do endosomu, kde dochází k výměně původního navázaného antigenního peptidu za nově vzniklý (Rock a Shen, 2005).

Tato cesta je označována jako TAP a proteasom nezávislá, uplatňuje se při prezentaci antigenů korpuskulárních, proteinů spojených s *E. coli* nebo Hsp proteinů spojených s peptidy. Komplex MHC I – peptid v tomto případě vzniká v subcelulárních kompartmentech, neprochází přes cytosol (Kurotaki *et al.*, 2007).



Obrázek 9.:Průběh zkřížené prezentace DC – cesta vakuolární. 1. vstupující molekula antigenu, 2. membránový receptor, 3. Catepsin S štěpící molekulu antigenu, 4. antigenní fragment 5. recyklace MHC I molekuly z buněčného povrchu, 6.vakuolární transport MHC I-původní antigen, 7. výměna původního antigenního fragmentu za nově vzniklý, 8. vakuolární transport komplexu MHC I-antigen, 9. Vystavení komplexu MHC I-antigen na buněčný povrch, 10. proteasom - nezapojen do této cesty, 11. ER – nezapojeno, 12. jádro - nezapojeno

Cesta mezerového spoje (Gap junction)

Mezerový spoj je zprostředkován proteinem konexinem, který tvoří intercelulární tunely, přes které mohou buňky komunikovat. Studie dokazují, že tento druh komunikace se uplatňuje i mezi dendritickými buňkami. Zralé dendritické buňky se po setkání s antigenem zapojují do komunikace s dalšími DC a vyčkávají na specifické T-lymfocyty. Spojení Gap junction je možné také mezi samotnými monocyty i mezi dendritickými buňkami a T-lymfocyty. Bylo zjištěno, že konexinové tunely jsou schopny přenosu peptidů, složených z méně než 10 aminokyselin. To znamená, že fragment antigenu vzniklý v jedné dendritické buňce nebo monocytu, může být prezentován prostřednictvím zkřížené prezentace buňkou vedlejší (Matsue *et al.*, 2006).

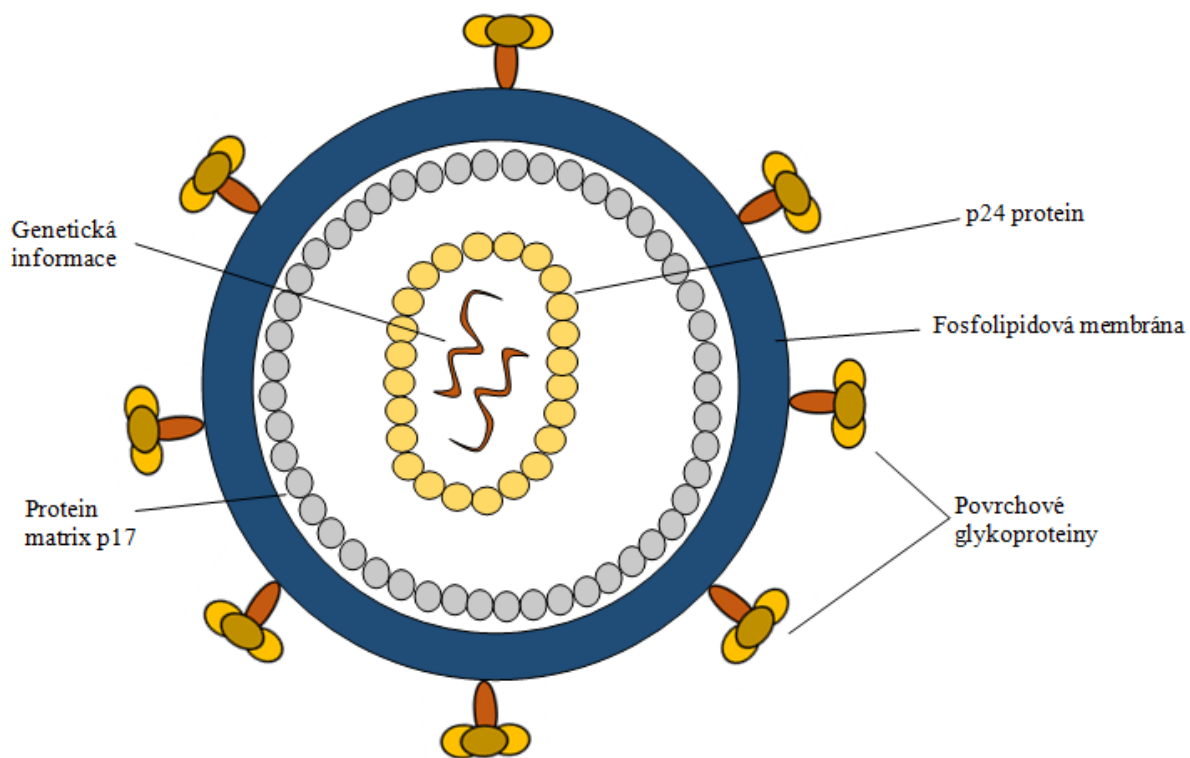
2.2 Charakterizace p24 (HIV) proteinu

Virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) se řadí mezi retroviry a napadá hlavně T-lymfocyty, monocyty a dendritické buňky, do nichž vstupuje prostřednictvím jejich receptorových molekul CD4. Po interakci virionu s receptorem dochází ke spojení membrány viru a buňky a ke vstupu virionu do cytoplazmy buňky. V infikované buňce se poté množí a způsobuje její rozpad (Yang *et al.*, 2019).

Nejdříve se předpokládalo, že i u infikovaných pacientů dochází k vyčerpání CD4⁺ lymfocytů, v závislosti na nepřetržité imunitní reakci. Poté však bylo prokázáno, že apoptosa je vyvolaná i u buněk HIV nenakažených. To ukazuje na fakt, že tento virus je schopen navodit apoptosu i jiným mechanismem. Napadené CD4⁺ Th (pomocné lymfocyty) jsou zodpovědné za produkci cytokinů, které zahajují specifickou imunitní odpověď. U viru HIV dochází k napadení Th2 typu CD4⁺ T-lymfocytů, tento typ vyvolává tvorbu protilátek u B-lymfocytů. Ztráta velkého množství CD4⁺ T-lymfocytů vede k narušení celkového imunitního systému (Badley *et al.*, 2000).

Protein p24 je součástí Gag polyproteinu HIV 1 (Obr. 10). Gag polyprotein zprostředkovává všechny důležité kroky v procesu sestavování virionových částic. Právě Gag polyprotein umožňuje zakomponování virového genomu, replikačních enzymů a Envelope (Env) glykoproteiny. Zapojuje se také při přenosu retroviru na cytoplazmatickou membránu (Woodward *et al.*, 2015).

Jádro virionu kryjí dvě kapsidy, vnitřní a vnější. Vnitřní kapsida je tvořena převážně proteinem p24, jehož hlavní funkcí je napomáhání při sestavování virionů. Na povrchu virionu se nachází vrstva glykoproteinu, který je antigenově velice rozmanitý a podle obsahujících antigenů se dělí na několik skupin. Naopak proteiny kapsidů jsou poměrně konzervativní, a to z důvodů menší variability genů kódujících tyto proteiny (Mücksch *et al.*, 2019).



Obrázek 10.: Struktura HIV viru, vyznačené povrchové glykoproteiny, fosfolipidová membrána, matrix protein p17, p24 protein a genetická informace

2.3 Liposomy

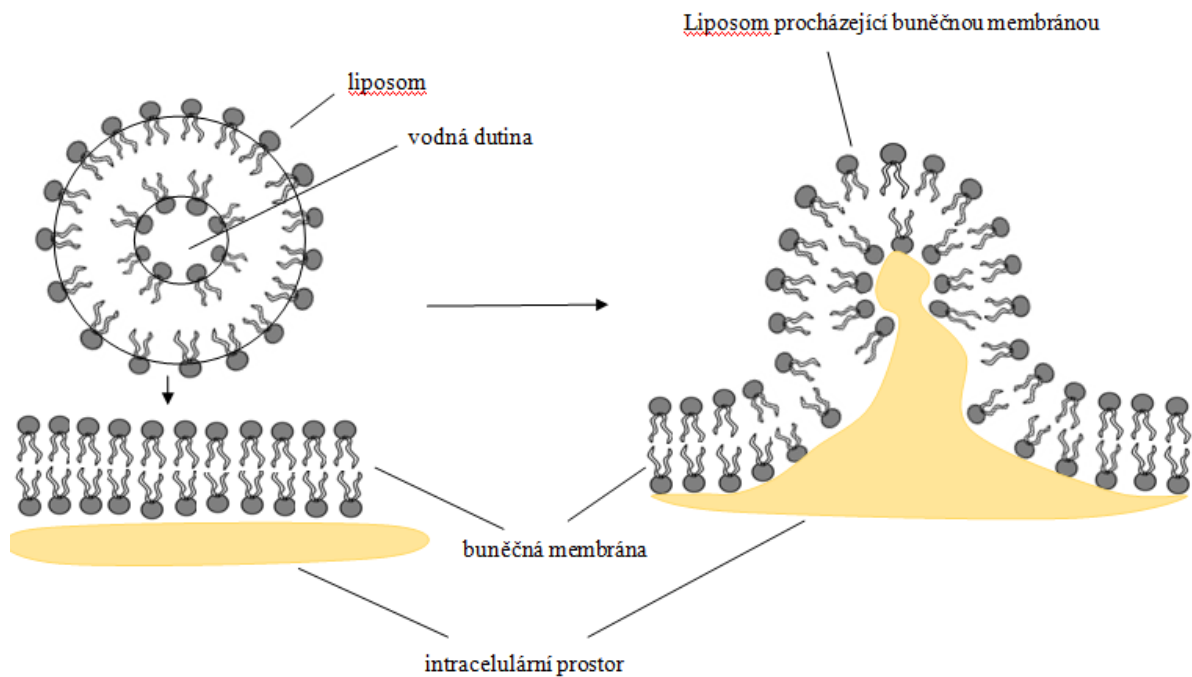
Některé antigeny jsou DC špatně rozpoznávány, proto se využívá vazby antigenu na látku pro DC dobře rozpoznatelnou. Jako adjuvans, zprostředkující rozpoznání antigenu je možno využít Heat Shock proteiny, nanočástice, nebo liposomy. Liposomy jsou sférické vezikuly, tvořené dvojvrstvou fosfolipidů, která obklopuje vnitřní vodnou dutinu (Obr. 11). Tyto částice se vyznačují svým pozitivním nábojem, díky kterému interagují s negativně nabitými látkami, jejich náboj jim také umožňuje přestupovat přes buněčné membrány (Li *et al.*, 2020).

Liposomů se využívá k transportu léčiv, které se do nich zabudovávají. Pro zlepšení vlastností liposomů se na jejich povrch zabudovávají různé látky, např. proteiny pro jejich zpevnění, cholesterol schopný ovlivňovat propustnost membrány, nebo látky reagující na specifické receptory buněk – mannan (Bartheldyová *et al.*, 2018). Bylo zjištěno, že vazbou liposomů na makrofágy, může docházet k vyvolání zánětlivé imunitní reakce – aktivace vrozeného imunitního systému. Po aktivaci vrozeného imunitního systému může nastávat také aktivace imunitního systému získaného. Získaný imunitní systém je aktivován prostřednictvím DC, které reagují na liposom jako na antigen a dojde k jeho endocytose (Li *et al.*, 2020).

Komplex antigen-liposom se váže na specifické receptory dendritické buňky, které umožňují prostoupení komplexu do buňky. Na povrchu DC je přítomno velké množství receptorů, díky kterým je endocytosa umožněna. Většina těchto receptorů patří do C-type lectin superfamily, nejznámější jsou Langerin (CD 207), manosový receptor (CD206), pro tuto interakci je typický také receptor DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), vyskytující se výhradně na DC. Mannosový receptor se vyskytuje kromě DC také na monocytech a makrofázích, některých endoteliálních buňkách, buňkách sítnicového epitelu, nebo tracheálních buňkách. Zmíněné receptory umožňují klatrin dependentní endocytosu antigenu (Gao *et al.*, 2020).

Lektinové receptory jsou charakteristické karbohydrátovou rozpoznávací doménou (CDR), která umožňuje interakci s proteiny, na jejichž postranních řetězcích se nachází manosa nebo galaktosa. Manosové receptory bývají z buněčného povrchu transportovány do časného endosomu, ze kterého jsou poté opět recyklovány na

buněčnou membránu. Během tohoto přenosu dochází k uvolnění ligandu (antigenu) navázaného na liposom, ten může být poté DC prezentován (Engering *et al.*, 2020).



Obrázek 11.: Znárodnění průchodu liposomu buněčnou membránou

2.4 Změna morfologie buněk z monocytů na dendritické buňky

Monocyty patří mezi agranulocyty, což jsou bílé krvinky vznikající v kostní dřeni. Jejich velikost se pohybuje mezi 12 až 20 μm . Jádro může být jak oválného, tak ledvinovitého tvaru, většinou bývá uloženo excentricky. Cytoplazma monocytů je bazofilní a obsahuje velké množství lysozomů. Monocyty jsou buňky se schopností fagocytosy, vyskytující se v krevním oběhu. V případě infekce monocyty prostupují diapedézou do tkání, kde diferencují na buňky monocytomakrofágového systému (např. dendritické buňky, makrofágy). U nově vzniklých buněk je zachována schopnost buněčného dělení a fagocytosy (Liu *et al.*, 2019).

Dendritické buňky byly poprvé izolovány v roce 1973. Tento nově identifikovaný typ buněk byl izolován z adherentní skupiny buněk, některých lymfatických orgánů myši. Ačkoli jsou tyto buňky přítomny v malých počtech, vyznačují se několika zřetelnými morfologickými znaky. Jádro buňky je velké, zakřivené a jsou přítomny většinou dvě jadérka. Vyznačují se hlavně nepravidelným tvarem, bohatou cytoplasmou a velkou četností mitochondrií (Steinman a Zanvil, 1973).

Dendritické buňky (DC) jsou hlavním představitelem buněk zprostředkujících antigen (APC), na svém povrchu obsahují jak MHC I, tak MHC II. DC zprostředkovávají spojení mezi vrozenou a specifickou imunitní odpovědí. Pokud není organismus v kontaktu s antigenem, dendritické buňky se v organismu vyskytují v nezralé formě a jejich úkolem je vázat na svůj povrch odumřelé buňky zdravých tkání. Tyto odumřelé buňky jsou zpracovány na peptidové fragmenty, které jsou navázány na molekuly MHC a jsou vystaveny na povrchu dendritických buněk. Tyto dendritické buňky nevyvolávají imunitní odpověď. Na počátku, když jsou DC přítomny v nezralé formě, mají velkou kapacitu pohlcovat antigeny. Po navázání antigenu na příslušný receptor dochází ke zrání DC, během tohoto procesu buňka ztrácí schopnost pohlcovat antigenní částice a mění se na funkční buňku APC. Zralé DC také zvyšují produkci molekul MHC, molekul CD80, CD86 a cytokinů (Liu *et al.*, 2019).

2.5 Přehled a funkce aktivačních markerů DC - CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86

CD80 a CD86

CD80 a CD86 řadíme mezi kostimulační molekuly, které jsou exprimovány zejména dendritickými buňkami po jejich aktivaci. Jsou to specifické povrchové molekuly, které při kontaktu buňky se specifickým antigenem poskytují T-lymfocytu proaktivační signál. S produkcí těchto kostimulačních signálů se setkáváme u dendritických buněk, po jejich aktivaci – po interakci s antigenem. Jejich aktivace vyvolá větší produkci MHC glykoproteinů a zvýší jejich schopnost pohlcovat antigen. Zároveň dojde na jejich povrchu k expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86, které aktivují T-lymfocyty. Receptorem pro tyto molekuly je CD28 na povrchu T-lymfocytu. Exprese CD80 a CD86 může být vyvolána také vysokou hladinou interferonu γ , což je cytokin, který je produkován buňkami vrozené imunity, při styku s antigenem (Kalantari *et al*, 2020).

CD40

Povrchový receptor CD40 je přítomen na dendritických buňkách, makrofázích nebo B-lymfocytech. Na molekulu CD40 (na povrchu APC) se váže ligand DC40L, který je exprimován aktivovanými T-lymfocyty. Tato vazba CD40-DC40L vede ke stimulaci APC k produkci dalších kostimulačních molekul a cytokinu IL-12. Produkovaný IL-12 podporuje aktivaci makrofágů, dochází tak k vyvolání Th1 imunitní odpovědi (Parker, 2016).

Při vazbě DC40L aktivovaného T-lymfocytu na CD40 B-lymfocytu dochází ke stimulaci B-lymfocytů k diferenciaci a tvorbě protilátek. Bylo prokázáno, že při knock-outování genu pro molekulu CD40 dochází k výraznému snížení stimulace k diferenciaci CD4⁺ T-lymfocytů (Kalantari *et al.*, 2020).

CD11b a CD11c

Z myeloidní progenitorové buňky se vyvíjí cirkulující monocyty, které putují do tkání, kde se mění v DC nebo makrofágy. DC a makrofágy sdílí některé povrchové molekuly a mají řadu podobných funkcí. Tyto buňky bývají rozlišovány podle specifických markerů, které jsou schopny exprimovat. Vysoká exprese CD11c a CD11b byla pozorována u aktivovaných DC, stejně jako produkce kostimulačních molekul CD80 a

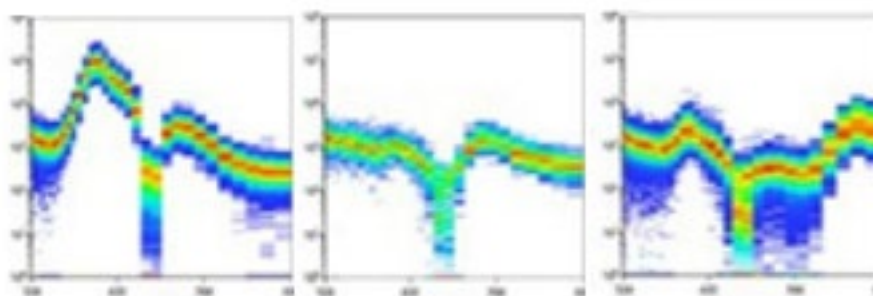
CD86. Exprese těchto molekul dendritickými buňkami je spojena s jejich zvýšenou schopností fagocytosy. Marker CD11c je spolu s markery CD163 a CD172a používán k rozpoznání makrofágů vzniklých z monocytů. Produkce těchto molekul stoupá při aktivaci makrofágů. (Baquero a Plattner, 2017).

2.6 Spektrální průtoková cytometrie

Spektrální cytometrie vznikla z klasické průtokové cytometrie, kdy není zachytávané světlo limitováno zrcadly a filtry, které jsou schopny zachytit pouze světlo o určité vlnové délce. Spektrální cytometr je schopen detekovat celé světelné spektrum od 420-800 nm. K detekci spektra je používán fotonásobič (PTM). PTM rozděljuje spektrum, které je schopen zachytit do 32 kanálů. Na rozdíl od klasického průtokového cytometru nejsou měřeny přímo emise pocházející z excitovaného fluorochromu, ale je zaznamenáván specifický tvar křivky referenčního spektra fluorochormu. (Hu *et al.*, 2019).

Pro cytometrická měření se využívá specifické vazby fluorescenčně značených protilátek, pomocí kterých můžeme identifikovat hledaný vzor (marker, buňkou produkováný antigen) a měřit jeho intenzitu. Používá se řada běžných fluorochromů, jako jsou fluorescein isothiokyanát (FITC), fykoerythrin (PE), peridinin-chlorofylprotein (PerCP) a alofykocyanin (APC). FITC, PE, PE-Cy-7 a PerCP dosahují optimální excitace při stejné vlnové délce 488 nm. To znamená, že pro tyto čtyři fluorochromy je potřeba pouze jeden laser, a to modrý (488 nm). Barviva jako eFluor506 a eFluor450 jsou excitována fialovým laserem (595 nm) (Virgo a Gibbs, 2012).

Spektrální cytometr sčítá veškerou naměřenou fluorescenci pocházející ze vzorku a teprve potom, s využitím metody unmixing, matematicky rozděljuje jednotlivá spektra. Pro měření založené na metodě unmixing je nutno nejdříve stanovit signál každého fluorochromu zvlášť, pro získání referenčního spektra (Obr. 12). K rozpoznání jednotlivých fluorochromů stačí, aby se křivky fluorochromů lišily v jednom ze 32 kanálů (Nolan *et al.*, 2012).



Obrázek 12.: Křivky referenčních spekter PE, PerCP-Cy 5.5, PE-Cy 7. Na ose x je vždy číslo kanálu PTM, na ose y intenzita fluorescence.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

- kompenzační kuličky UltraComp eBeads (Invitrogen, CA, USA)
- buňky myši BALB/c
- protilátky značené fluorochromy – anti-MHC I-eFluor450, anti-CD11c-eFluor506, anti-CD80-PerCP-cy 5.5, anti-CD86-PE-Cy7, anti-CD40-PE, anti-MHC II-PE-eFluor 610(e-Bioscience, CA, USA)
- značené protilátky (konfokální mikroskopie) - mouse anti-V5-Fitc, rabbit anti EEA1, goat anti-rabbitIgG-cy3 (Invitrogen, CA, USA), montovací médium s DAPI (Vector, CA, USA).
- 10x koncentrovaný roztok PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- 5% Fetální bovinní sérum FBS Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA)
- RPMI + glutamin (Invitrogen, CA, USA)
- 100x Penicillin-streptomycin antibiotikum
- lyzační pufr červených krvinek - Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- cytokiny – GM-CSF, IL-4 (Invitrogen, CA, USA)
- peptid (p24-liposom)
- lipopolysacharid z *E. coli* (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- paraformaldehyd 4%
- permeabilizační činidlo TRITON X-100 (10%) (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- EtOH(P-LAB, ČR)

Roztoky

- kompletní kultivační RPMI médium - 500 ml obsahovalo - RPMI + 10% (50 ml) inaktivovaného séra FBS + AB 1% (5 ml) penicillin-streptomycin
- roztok primárních protilátek - roztok 1% FBS v PBS + protilátky (V5- Fitc v poměru (1:500), rabbit x EEA1 v poměru (1:100)).
- roztok sekundárních protilátek -roztoku 1% FBS v PBS a protilátka goat anti – rabbit IgG-cy3 v poměru 1:1000.

3.1.2 Laboratorní vybavení

- spektrální cytometr SP6800 (SONY, Japonsko)
- centrifuga (Hettich, Německo)
- vortex (IKA, Německo)
- CO₂ Inkubátor (Panasonic, Japonsko)
- laminární box AuraVF48 (BioAir, USA)-
- cytospin Stattspin Cytofuge 12 (Iris, Francie)
- pipety Finnpiptette (Thermo Fisher, MA, USA)
- pipetor (Hirschmann, Německo)
- mikrozkuhavky (Eppendorf, Německo)
- injekční jehla Sterican 0,40 x 12 mm (B. Braun, Německo)
- mikroskop pro počítání buněk (Leica Microsystems, Německo)
- plastové nádoby pro tkáňové linie (VWR, PA, USA)

3.1.3 Metody

3.1.3.1 Založení knihovny fluorochromy značených protilátek pro spektrální cytometrii

Pro měření byly využity kompenzační kuličky UltraComp eBeads. UltraComp eBeads obsahují dvě populace, a to pozitivní a negativní populaci. Do pozitivní populace spadají kuličky, které jsou schopny vázat na svůj povrch použité protilátky. Pozitivní populace UltraComp eBeads je schopna vázat protilátky pocházející z myši, krysy, nebo křečka. Negativní populace protilátky neváže a využívá se k porovnání značených a neznačených spekter. Byly měřeny fluorochromy značené protilátkami anti-MHC I-eF450, anti-CD11c-eF506, anti-CD80-PerCP-cy 5.5, anti-CD86-pe-cy7, anti-CD40-PE, anti-MHC II-PE-eFluor 610

Příprava vzorků:

- Před použitím byly UltraComp eBeads krátce promíchány na vortexu.
- Do plastových mikrozkuhovek (1,5ml) byla vnesena vždy jedna kapka UltraComp eBeads (50 μ l) a 5 μ l jedné ze značených protilátek.
- Připravené vzorky byly krátce vortexovány a inkubovány 15 min, při 5° C ve tmě.
- Poté byl přidán 1 ml PBS a vzorky byly centrifugovány při 500 x g 5 min.

- Supernatant byl odsát a byl přidán 300 μ l PBS.
- Vzorky byly změřeny pomocí spektrálního cytometru. U každého byla označena pozitivní a negativní populace.
- Tato data byla zadána do knihovny fluorochromů pro následné použití.

3.1.3.2 Příprava dendritických buněk z kostní dřevě

Den 0- izolace buněk a nasazení do média

- Po usmrcení myši byly vyjmuty dlouhé kosti dolních končetin – femur a tibiae.
- Kostí byly nejdříve vloženy do EtOH, který byl využit k desintegraci zbylých tkání a fixaci fibroblastů, poté byly vloženy do sterilního media (PBS).
- Z kostí byla po odstranění epifýz sterilním médiem vypláchnuta kostní dřevě - za použití 20ml stříkačky a injekční jehly.
- Vypláchnuté buňky kostní dřevě byly přeneseny do kompletního kultivačního média RPMI.
- Následovala centrifugace při 250 x g, 5 min při laboratorní teplotě.
- Červené krvinky byly lyzovány lyzačním pufrem.
- Buňky byly promyty PBS a centrifugovány 250g, 5 min při laboratorní teplotě.

Barvení buněk methylenovou modří a počítání v Bürkerově komůrce

- Buňky byly v Bürkerově komůrce obarveny methylenovou modří (buněčná suspenze byla s barvivem v poměru 1:1), a spočítány pod mikroskopem
- Buňky zabarvené modře nebyly počítány, protože methylenová modř prochází pouze stěnou mrtvých buněk
- Podle následujícího vzorce byla určena koncentrace buněk v suspenzi
- $c = \frac{a \times 10^4}{b}$, kde c je výsledná koncentrace, a je počet buněk a b počet spočítaných čtverců v Bürkerově komůrce
- Buňky byly resuspendovány do 7 ml kompletního kultivačního média s přidáním cytokiny IL-4 (20ng/l) a GM-CSF (20ng/l) tak, aby jejich konečná koncentrace byla 1mil buněk/ml média.
- Byly použity 25cm² kultivační lahve.
- Kromě čerstvě izolovaných monocytů byly stejným způsobem diferencovány také dva vzorky monocytů zmražených – Frozen 1 a Frozen 2.

Den 2 + den 4 - výměna média

- 5 ml média s buňkami bylo odebráno z plastické kultivační lahve a stočeno (250 x g, 5 min), buňky byly resuspendovány v čerstvém kompl. médiu s cytokiny - 20ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4, poté byly navraceny zpět

Den 6- ukončení kultivace

- Diferenciace DC byla zhodnocena pomocí světelného mikroskopu, kdy byl vzorek buněk nanesen na podložní sklíčko a pozorován při zvětšení 200-400x
- Po ukončení kultivace byly buňky nasazeny do 24-jamkové destičky. Rozmístění vzorků viz. Tabulka 1.
- Ke vzorkům buněk sloužícím jako pozitivní kontrola byl přidán lipopolysacharid (LPS), (200ng/ml).
- K ostatním vzorkům buněk (Fresh, Frozen 1, Frozen 2) byl přidán peptid p24-liposom (0,1mg/ml).
- Vzorky negativní kontroly byly ponechány bez přídavku p24-liposom.

Tabulka 1.: Rozmístění vzorků na destičce

Fresh	Frozen 1	Frozen 2	LPS - fresh	NS - fresh
Fresh	Frozen 1	Frozen 2	LPS - frozen 1	NS - frozen 1
Fresh	Frozen 1	Frozen 2	LPS - frozen 2	NS - frozen 2

Kultivace buněk v destičce

- 24h pro spektrální cytometrii
- 1,5h pro konfokální mikroskopii

3.1.3.3 Charakterizace diferenciovaných buněk spektrální cytometrii

- Vzorky z destičky byly přepipetovány do mikrozkuavek, ke každému vzorku bylo přidáno 750 µl PBS, poté byly vzorky centrifugovány 5 min (250 x g).
- Supernatant byl odsát.
- Byl připraven premix média s protilátkami – 712 µl PBS, 37.5 µl FBS a 5 µl každé z protilátek (anti-MHC I-eFluor450, anti-CD11c-eFluor506, anti-CD80-PerCP-cy 5.5, anti-CD86-PE-Cy7, anti-CD40-PE, anti-MHC II-PE-eFluor 610).
- Ke každému vzorku bylo přidáno 75 µl premixu, vzorky byly inkubovány 30 min, ve tmě, při laboratorní teplotě.

- Poté byl ke vzorům přidán 1 ml PBS, vzorky byly centrifugovány (5 min, 250 x g), supernatant byl odsát.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 300 μ l PBS, buněčná suspenze byla přepipetována do zkumavek určených k měření na spektrálním cytometru.

Nastavení protokolu na průtokovém cytometru

- Ze založené knihovny byla stažena data, naměřená pro jednotlivé fluorochromy.
- Napětí na laserech (PMT) bylo zvoleno tak, aby maximální intenzita fluorescence u pozitivního vzorku byla mezi 10^4 a 10^5 a současně úroveň saturace byla nižší než hodnota 1 (doporučený postup výrobce).
- Ke každému fluorochromu (k naměřeným signálům z excitovaných fluorochromů) byl přiřazen daný marker.
- MHC I- eF450, CD11c- eF506, CD80 -PerCP-cy 5.5, CD86-pe-cy7, CD40-PE, MHC II-PE-eFluor 610.

The screenshot shows the software interface for a flow cytometer. It includes a top menu bar with options like File, Analysis, Unmixing, and Cytometer. Below this is a toolbar with icons for various operations. The main area is divided into several panels:

- Experiment Explorer:** Shows a list of experiments with search filters.
- Color Palette:** A table for assigning markers to fluorochromes and lasers.

Marker	Fluorochrome	488nm Laser	405nm Laser
CD40	PE		
MHCII	PE-eFluo610		
CD80	PE-Cy5		
CD86	PE-Cy7		
MHCI h2kD	eF450		
- Unmixing:** A table for setting up unmixing parameters.

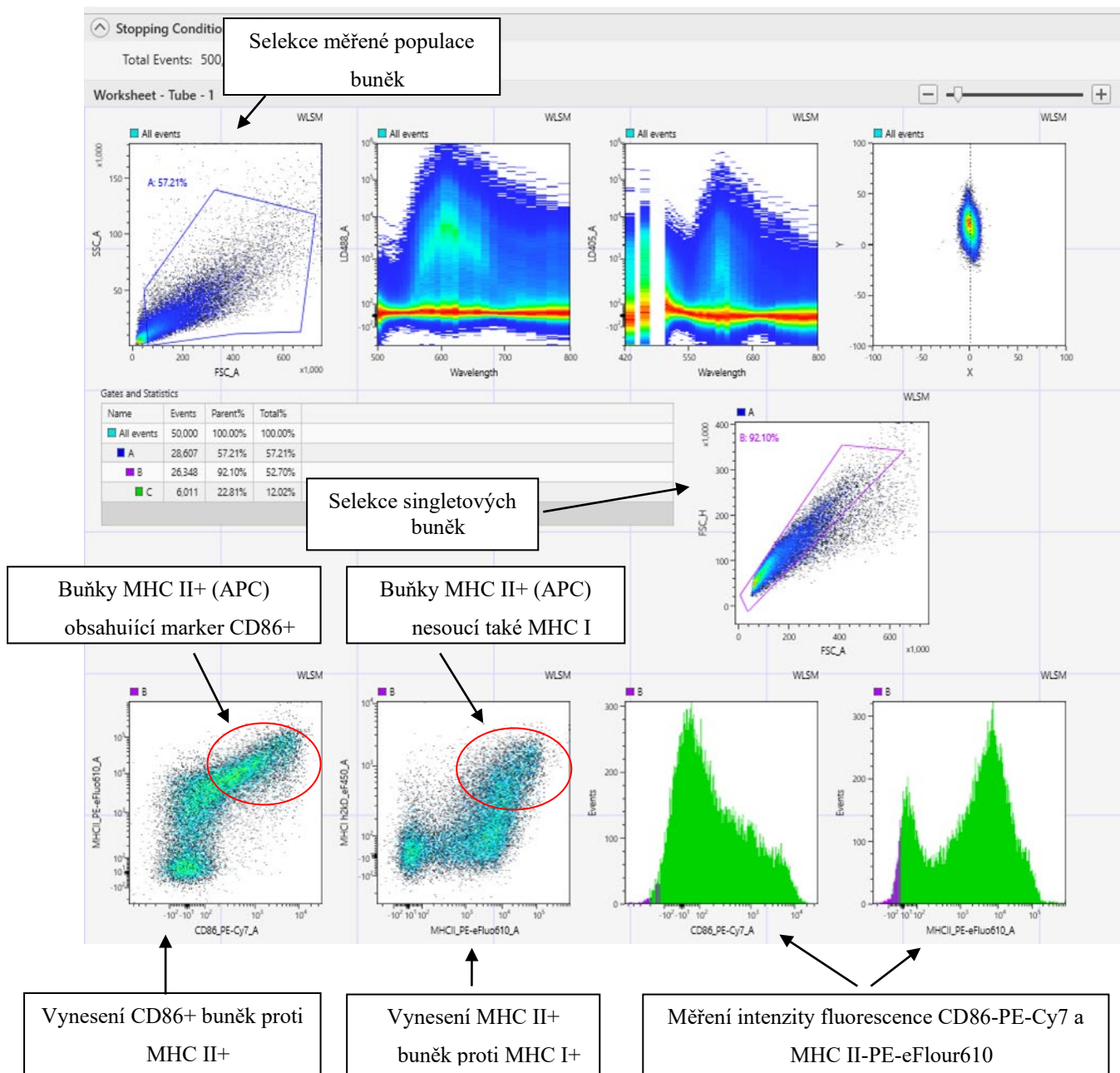
Fluorochrome	Negative	Positive
PE	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/> SRL:CD40
PE-eFluo610	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/> SRL:MHCII
PE-Cy5	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/> SRL:CD80
PE-Cy7	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/> SRL:CD86
eF450	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/> SRL:MHC...
- Tube List:** A table showing the list of tubes and their corresponding data.

Status	Order	Sample Name	Sample Group	Events	Cell Conc
	1	Tube - 1	Sample Group - 1	50,975	
	2	Tube - 2	Sample Group - 1	50,000	
	3	Tube - 3	Sample Group - 1	20,288	
	4	Tube - 4	Sample Group - 1	20,379	
	5	Tube - 5	Sample Group - 1	20,460	
	6	Tube - 6	Sample Group - 1	18,454	
	7	Tube - 7	Sample Group - 1	10,098	
	8	Tube - 8	Sample Group - 1	10,061	
	9	Tube - 9	Sample Group - 1	10,047	
	10	Tube - 10	Sample Group - 1	6,018	
	11	Tube - 11	Sample Group - 1	1,021	
	12	Tube - 12	Sample Group - 1	1,185	
	13	Tube - 13	Sample Group - 1	1,508	
- Cytometer Settings - Tube - 1:** Shows various instrument parameters like flow rate, laser settings, and thresholds.

Callouts in the image point to specific features:

- Přiřazení markeru k fluorochromu:** Points to the Color Palette table.
- Přiřazení pozivní populace značených komp. kuliček k jednotlivým fluorochromům:** Points to the Unmixing table.
- Měřené vzorky:** Points to the Tube List table.
- Počet naměřených událostí (buněk):** Points to the 'Events' column in the Tube List table.

Obrázek 13.: Nastavení protokolu na průtokovém cytometru, přiřazení fluorochromů k měřeným markerům



Obrázek 14.: Nastavení protokolu na průtokovém cytometru, selekce měřených populací buněk

3.1.3.4 Analýza pomocí konfokální mikroskopie

- 50 μ l buněk kultivovaných s p24-liposom (0,1 mg peptidu/ml) a cytokiny, bylo centrifugováno – 250 x g, 5 min, promyto 1 ml PBS.
- Buňky byly aplikovány na mikroskopická sklíčka pomocí centrifugace na cytospinu – 350 x g, 3 min, laboratorní teplota.
- Následně bylo přidáno 50 μ l 4% paraformaldehydu k zafixování buněk (10 min. laboratorní teplota).
- Byly použity vzorky Frozen 1, Frozen 2 a Fresh.

Barvení buněčných kompartmentů a p24 proteinu

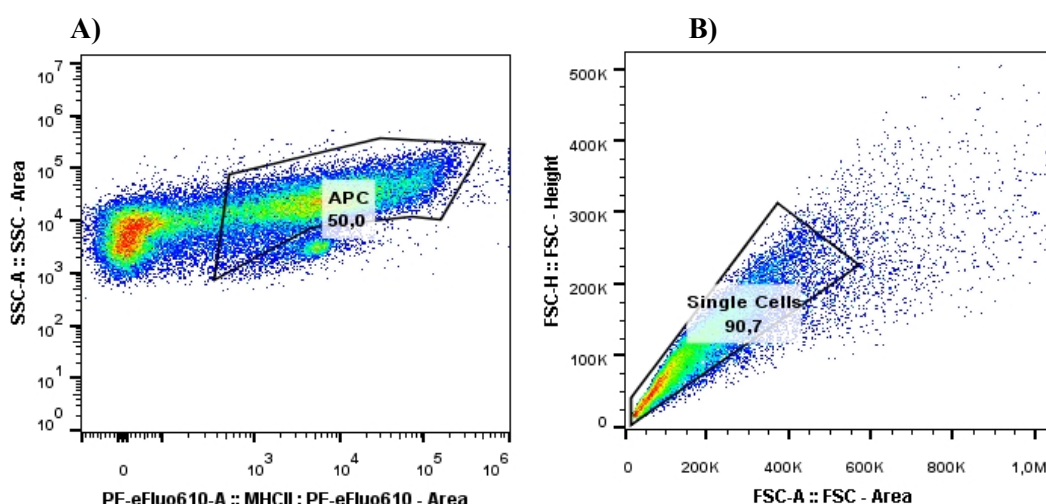
- K zafixovaným buňkám bylo přidáno 50 μ l PBS, následně byl volný roztok odsát.
- Poté bylo použito permeabilizační činidlo TRITON X-100 (0,1%), doba inkubace 10 min, při laboratorní teplotě.
- Po odsátí činidla a promytí 50 μ l PBS bylo přidáno 50 μ l roztoku obsahujícího 1% FBS a 0,1 % TRITON X-100 – k zablokování nespecifických vazeb.
- Následně byly vzorky 3x promyty PBS.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 50 μ l roztoku primárních protilátek (kultivace 1 h ve tmě, při laboratorní teplotě).
- Vzorky byly promyty v PBS.
- Ke každému vzorku bylo přidáno 50 μ l roztoku sekundárních protilátek (kultivace 30 min ve tmě, laboratorní teplota).
- Vzorky byly 3x promyty v PBS a ošetřeny montovacím médiem obsahujícím DAPI pro vizualizaci DNA a přikryty krycím sklíčkem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Spektrální cytometrie

K vyhodnocení naměřených dat byl použit program FlowJo. Aby bylo možné vyhodnotit četnost značených povrchových markerů u měřených vzorků buněk, nejdříve bylo zapotřebí vyselektovat cílovou skupinu buněk. Byly vybrány pouze buňky APC – tedy buňky obsahující na svém povrchu MHC II molekulu (Obr. 12A). Z této skupiny identifikovaných buněk APC byly vybrány pouze ty, jevící se jako samostatné – tzv. singlem (Obr. 14B). Tím byly odstraněny buněčné shluky a poškozené buňky. Tento výběr byl aplikován na všechny měřené vzorky. Četnost jednotlivých markerů byla porovnána vždy mezi buňkami ze skupin Fresh, Frozen 1 a Frozen 2.

Následující grafy jsou pouze ilustrativní, pro porovnání byly zvoleny náhodné vzorky ze skupin Fresh, Frozen 1 a Frozen 2. Buňky čerstvě izolované (Fresh) jsou vždy značeny červeně, buňky zmražené - Frozen 1 jsou modře, Frozen 2 oranžově.

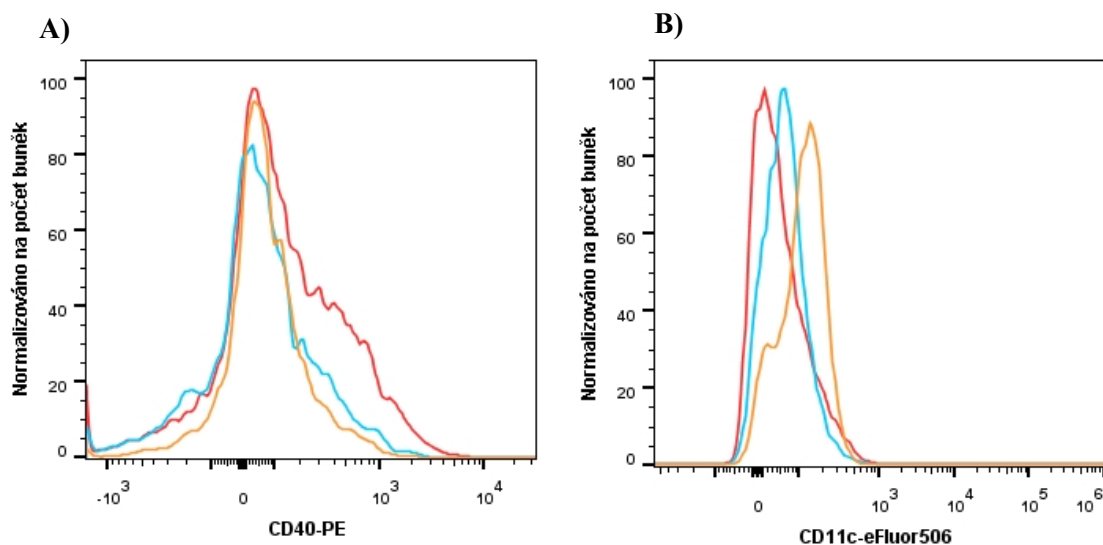


Obrázek 15.: A) selekce buněk obsahujících na povrchu molekulu MHC II (buňky APC). B) výběr pouze samostatných buněk

Měřený marker CD40, bývá typicky exprimován na buňkách APC při vyvolání (MHC II) Th2 imunitní odpovědi. Přítomnost této povrchové molekuly je nutná k aktivaci B-lymfocytů, které jsou schopny tvořit protilátky. Tato molekula se také uplatňuje při aktivaci makrofágů. Největší produkce tohoto markeru byla zaznamenána u buněk čerstvě izolovaných, u obou vzorků zmražených buněk byla exprese CD40 nižší.

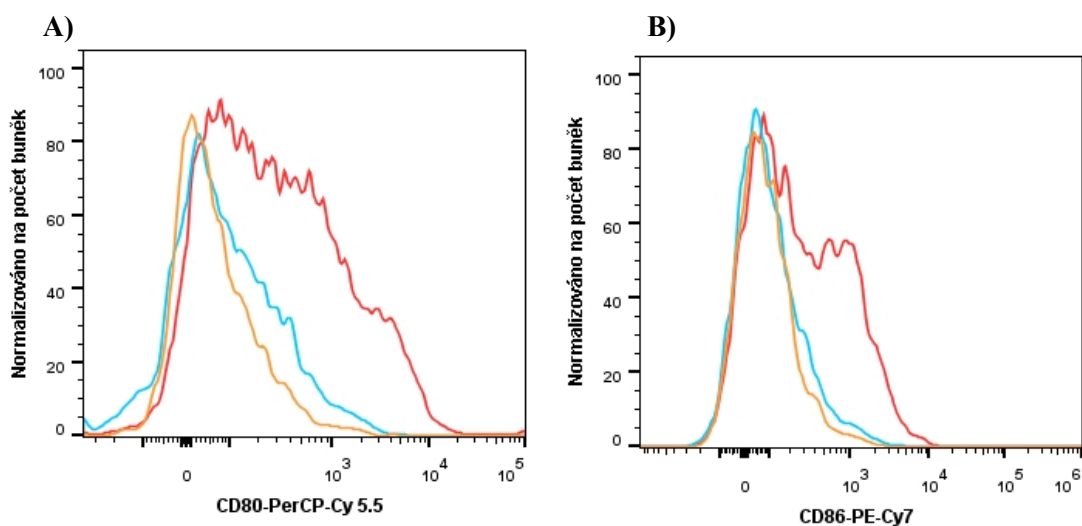
Marker CD11c se hojně vyskytuje na povrchu aktivovaných DC a u makrofágů vzniklých z monocytů. Přítomnost CD11c molekuly dokazuje jak přítomnost

aktivovaných DC ve vzorku, tak možnost aktivace makrofágů – Th1 typ imunitní odpovědi.



Graf 1: A) porovnání četnosti výskytu povrchového markeru CD40 u buněk ze skupin Fresh - červená, Frozen 1 - modrá a Frozen 2 - oranžová. B) porovnání četnosti výskytu markeru CD11c u buněk ze skupin Fresh - červená, Frozen 1 - modrá a Frozen 2 - oranžová.

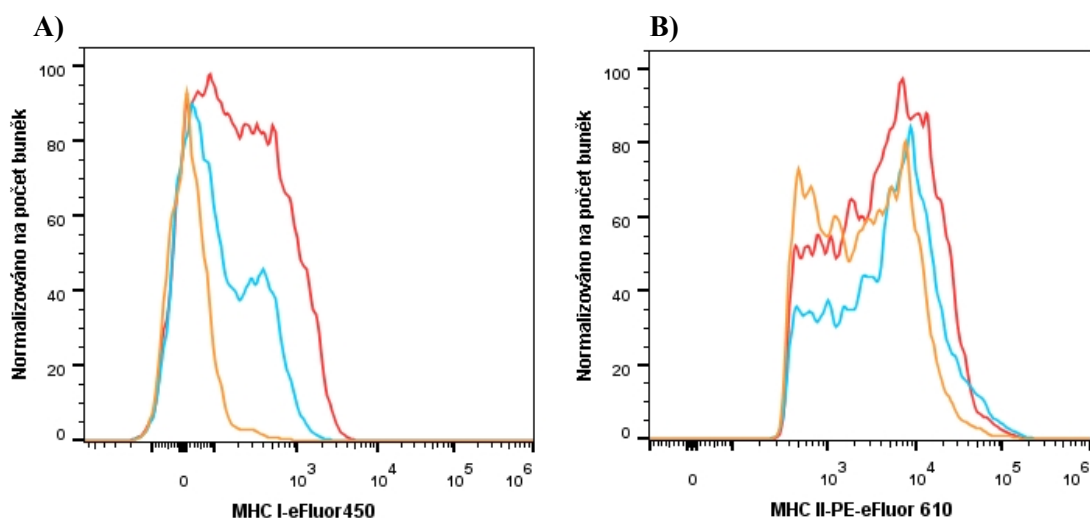
Dalšími z hodnocených markerů byly CD80 a CD86. Expres těchto molekul, značících přítomnost aktivovaných DC, byla výrazně nejvyšší u buněk čerstvě izolovaných. U vzorků buněk zmrazených byla expres nižší, u těchto vzorků (Frozen 1 a Frozen 2) byly naměřeny téměř stejné hodnoty.



Graf 2: Porovnání povrchových molekul CD80 (A) a CD86 (B) na vzorcích buněk ze skupiny Fresh – červeně, Frozen 1 – modře, Frozen 2 – oranžově.

Molekuly MHC II mají na svém povrchu pouze buňky APC, molekuly MHC I mají všechny jaderné buňky v organismu. Nejvíce buněk APC bylo podle naměřených

hodnot přítomno ve vzorcích buněk čerstvě izolovaných. Podle hodnot z předchozích měření (markery CD80 CD86) se nejspíše jedná o aktivované DC. Největší zastoupení MHC I molekul bylo naměřeno také u buněk Fresh.

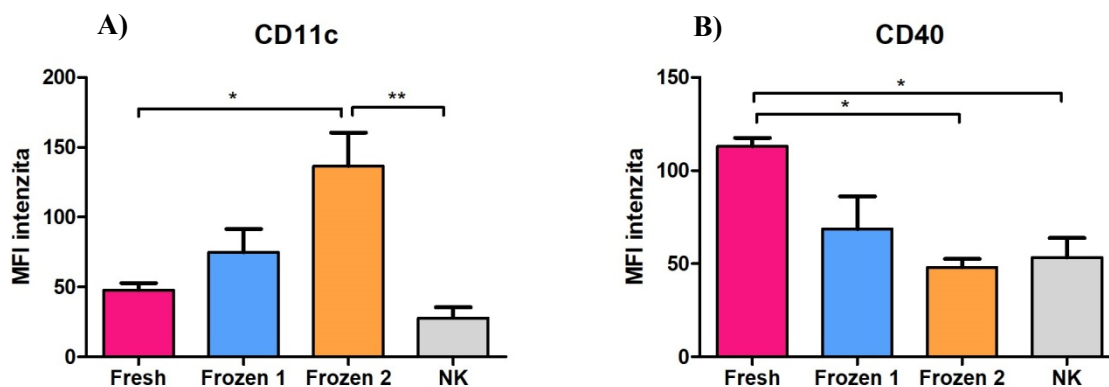


Graf 3.: Porovnání povrchových molekul MHC I (A) a MHC II (B) na vzorcích buněk ze skupiny Fresh – červeně, Frozen 1 – modře, Frozen 2 – oranžově.

Vyhodnocení získaných dat ze spektrální cytometrie pomocí programu GraphPad

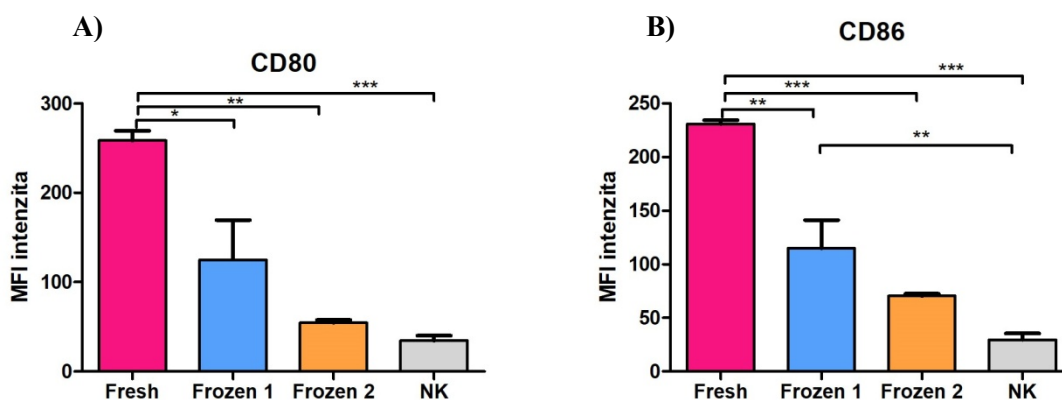
Hodnoty MFI (median fluorescence intensity), vyhodnocené programem FlowJo byly přeneseny do programu GraphPad a znázorněny pomocí krabicových grafů. V těchto grafech jsou zahrnuty naměřené hodnoty MFI pro všechny vzorky (vzorky byly vždy v tripletech).

Prvními porovnávanými markery byly molekuly CD11c a CD40. Signifikantní rozdíl v expresi CD11c byl pozorován mezi buňkami Fresh a Frozen 2. Významný rozdíl byl zaznamenán také u exprese CD11c mezi buňkami Fresh a negativní kontrolou. Jako statisticky signifikantní byl určen i rozdíl v expresi markeru CD40 mezi buňkami Fresh a Frozen 2, také mezi Fresh a negativní kontrolou.



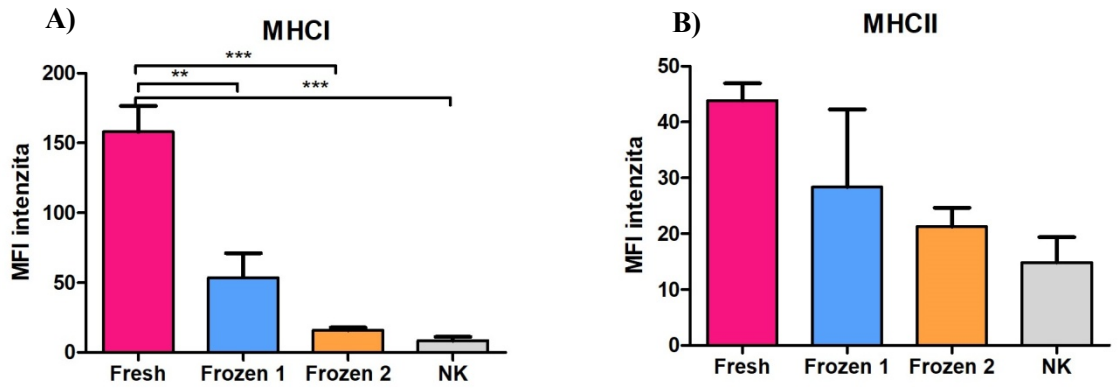
Graf 4.: Porovnání výskytu markerů CD11c (A) a CD40 (B) u vzorků buněk Fresh, Frozen 1 a Frozen 2. (Hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Statistická signifikance byla pozorována při porovnání exprese molekul CD80 a CD86 mezi buňkami Fresh a Frozen. V obou případech (CD80 a CD86) byly naměřeny také výrazně rozdílné hodnoty exprese mezi buňkami Fresh a negativní kontrolou. Markery vypovídající o přítomnosti aktivovaných DC (CD80 a CD86) byly v nejvyšší míře detekovány u buněk Fresh. U vzorků Frozen 1,2 byla prokázána menší kapacita aktivace DC. U buněk negativní kontroly, která nebyla pulsována antigenem, téměř nedošlo k aktivaci DC.



Graf 5.: Porovnání výskytu markerů CD80 (A) a CD86 (B) u vzorků buněk Fresh, Frozen 1 a Frozen 2. (Hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$).**

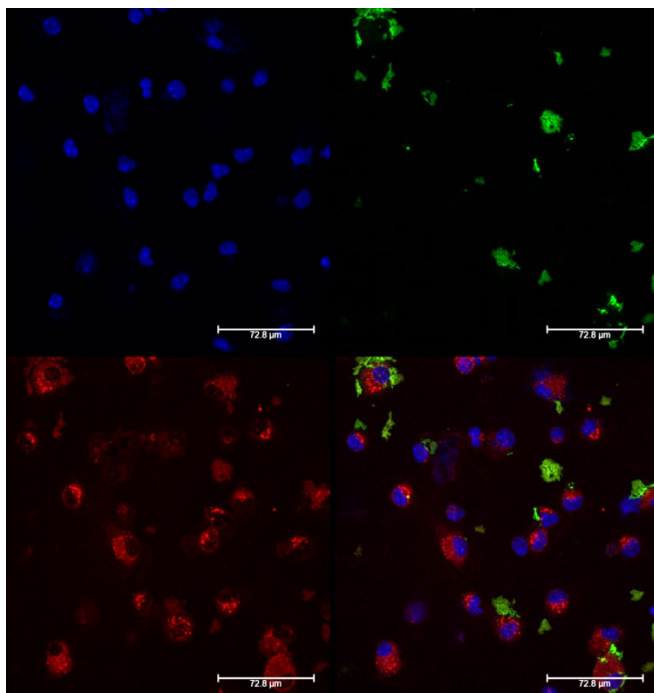
Při porovnávání výskytu molekul MHC I byla zjištěna signifikance mezi buňkami Fresh a Frozen, jako významný byl hodnocen také rozdíl v expresi mezi buňkami Fresh a negativní kontrolou. Při porovnání četnosti molekuly MHC II u měřených vzorků pozorujeme zdánlivé zvýšení exprese u buněk Fresh, avšak tento rozdíl oproti ostatním vzorkům nebyl hodnocen jako statisticky významný.



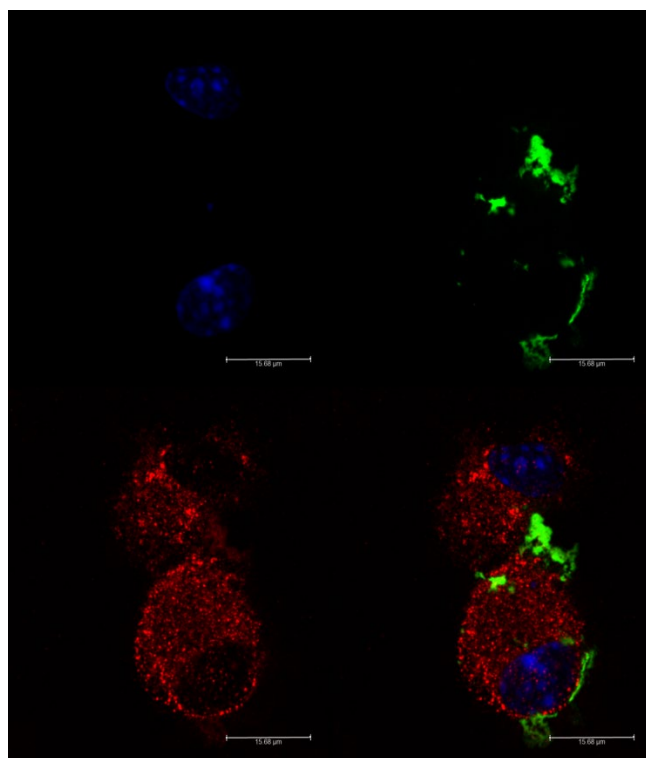
Graf 6.: Porovnání výskytu povrchových molekul MHC I (A) a MHC II (B) u vzorků buněk Fresh, Frozen 1 a Frozen 2. ((Hodnoty signifikance byly vypočítány statistickou metodou ANOVA s použitím Tukey post-testu, kdy platí * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.2 Snímky z konfokální mikroskopie

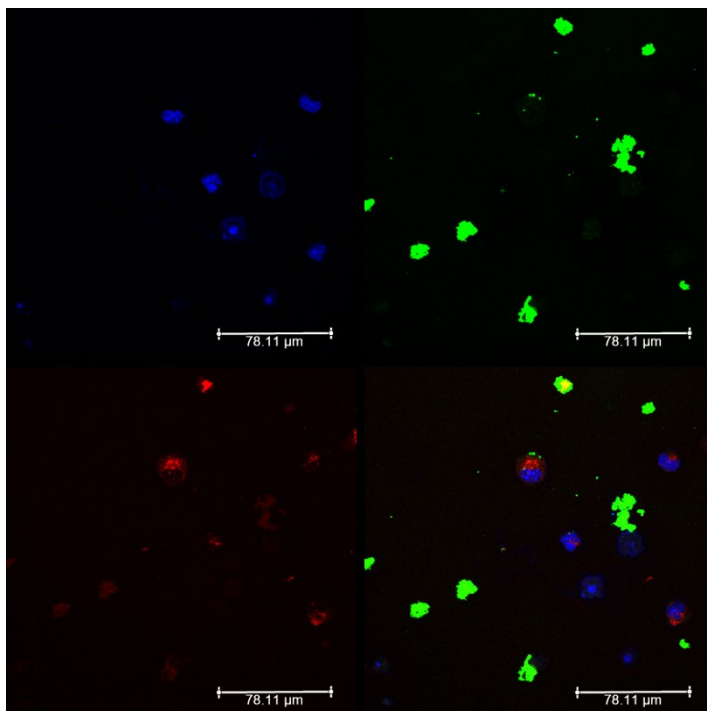
Snímky zobrazují protilátkou značené buněčné části, po 1,5 hod. pulzace antigenem.



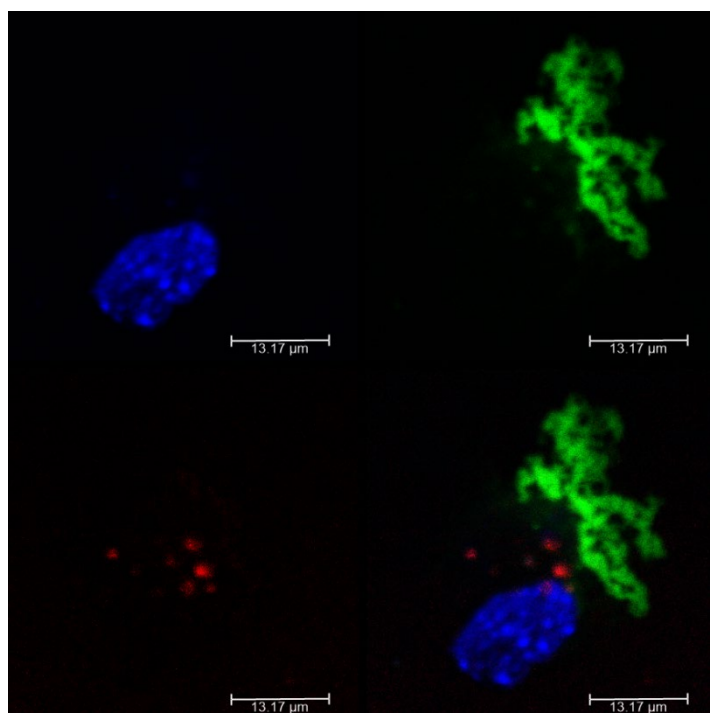
Obrázek 16.: vyobrazení částí buňky (Fresh) pomocí konfokálního mikroskopu, modře značeny jádra buněk (barvivo DAPI), červeně časné endosomy (využití primární protilátky rabbit anti-EEA1 a sekundárního goat-anti rabbit IgG-cy3), zeleně p24 protein (mouse anti-V-5 Fitc)



Obrázek 17.: vyobrazení částí buňky (Fresh) pomocí konfokálního mikroskopu, modře značeny jádra buněk (barvivo DAPI), červeně časné endosomy (využití primární protilátky rabbit anti-EEA1 a sekundárního goat-anti rabbit IgG-cy3), zeleně p24 protein (mouse anti-V-5 Fitc).



Obrázek 18.: vyobrazení částí buňky (Frozen) pomocí konfokálního mikroskopu, modře značeny jádra buněk (barvivo DAPI), červeně časné endosomy (využití primární protilátky rabbit anti-EEA1 a sekundárního goat-anti rabbit IgG-cy3), zeleně p24 protein (mouse anti-V-5 Fitc).



Obrázek 19.: vyobrazení částí buňky (Frozen) pomocí konfokálního mikroskopu, modře značeny jádra buněk (barvivo DAPI), červeně časné endosomy (využití primární protilátky rabbit anti-EEA1 a sekundárního goat-anti rabbit IgG-cy3), zeleně p24 protein (mouse anti-V-5 Fitc).

Na snímcích vyobrazujících buňky ze vzorů Fresh, si můžeme všimnout daleko většího zastoupení vytvořených endosomů, než v případě snímků buněk Frozen. Na obrázku 16. je vidět, že již došlo k navázání antigenu na dendritickou buňku.

4.3 Diskuze

Po izolaci monocytů z femurů BALB/c myši byla jejich diferenciaci na DC v prostředí GM-CSF a IL-4 zhodnocena pomocí světelného mikroskopu. Rozlišné tvary naznačovaly kromě dendritických buněk také přítomnost nediferencovaných monocytů a makrofágů. Expresí povrchových molekul byla analyzována pomocí spektrální cytometrie. Pomocí markerů CD11c a MHC II byl potvrzen výskyt DC ve vzorcích. Při měření četnosti jednotlivých povrchových markerů, byla zaznamenána daleko vyšší schopnost exprese CD40, CD80, CD86, MHC I i MHC II u buněk čerstvě izolovaných. Výrazně vyšší produkce CD80 a CD86 u čerstvě izolovaných buněk, dokazuje daleko větší zastoupení aktivovaných DC ve vzorku. Naměřené hodnoty exprese CD40 markeru vypovídají o lepší schopnosti vyvolání CD4⁺ T lymfocytární imunitní odpovědi, vedoucí k tvorbě protilátek, a to opět u buněk čerstvě izolovaných.

Také zvýšená produkce MHC I molekul u čerstvých buněk dokazuje daleko vyšší kapacitu aktivovaných DC.

Ze snímků z konfokálního mikroskopu lze vyvodit, že čerstvě izolované DC jsou již po hodině a půl po pulzaci antigenem velice dobře připraveny přítomný antigen pojmout. To dokazují hlavně velice dobře vyvinuté endosomy. Naproti tomu u DC pocházejících ze zmražených vzorků pozorujeme daleko nižší tvorbu časných endosomů. Lze tedy říci, že tyto buňky nejsou připraveny přítomný antigen tak efektivně procesovat. Vzhledem k tomu, že po ukončení pulsace antigenem, byly vzorky promyty v PBS, můžeme předpokládat, že vizualizované antigenní konstrukty jsou vždy navázané na buněčnou membránu DC. Nenavázaný antigen by byl s největší pravděpodobností odmyt.

5 ZÁVĚR

Z naměřených výsledků vyplývá, že zmražené monocyty nejsou pro práci zaměřenou na měření povrchových markerů DC vhodné. U zmražených DC je výrazně snížena schopnost exprese aktivačních markerů. DC diferencované ze zmražených mononukleárů, nejsou schopny vyvolat tak efektivní imunitní odpověď jako DC pocházející z monocyტů čerstvě izolovaných. Bylo potvrzeno, že DC byly po setkání s antigenem p24-liposom aktivovány. Otázkou je, které konkrétní T-lymfocyty byly schopny stimulovat? Přínosné by bylo v budoucích experimentech porovnat zastoupení stimulovaných CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocyტů (popř. jejich subpopulací), po setkání s takto aktivovanými DC.

Ze snímků z konfokálního mikroskopu lze vyvodit, že čerstvě izolované DC jsou již po hodině a půl po pulzaci antigenem velice dobře připraveny přítomný antigen pojmout. U zmražených DC je schopnost tvořit endosom viditelně redukována. Z časových důvodů byly pomocí konfokální mikroskopie měřeny pouze vzorky po 1,5 h pulzace. Pro detailnější analýzu by bylo relevantní provést další měření, znázorňující chování buněk po 2, 4 hodinách pulzace.

6 LITERATURA

- Attias M., Al-Aubodah T., Piccirillo C. A. (2019): Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY* **197**, 36-51.
- Badley A. D., Pilon A. A., Landay A., Lynch D. H. (2000): Mechanisms of HIV associated lymphocyte apoptosis. *BLOOD* **96**, 2951-2964.
- Baquero M. M., Plattner B. L. (2017): Bovine WC1+ and WC1neg $\gamma\delta$ T Lymphocytes Influence Monocyte Differentiation and Monocyte-Derived Dendritic Cell Maturation during In Vitro Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Infection. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* **8**, 534.
- Bartheldyova E., Knotigova PT., Zachova K., Masek, J., Kulich, P., Effenberg R., Zyka D., Hubatka F., Kotoucek J., Celechovska H., Hezova R., Tomeckova A., Maskova E., Fojtikova M., Macaulay S., Bystricky P., Paulovicova L., Paulovicova E., Droz L., Ledvina M., Raska M., Turanek J. (2018): N-Oxy lipid-based click chemistry for orthogonal coupling of mannan onto nanoliposomes prepared by microfluidic mixing: Synthesis of lipids, characterisation of mannan-coated nanoliposomes and in vitro stimulation of dendritic cells. *CARBOHYDRATE POLYMERS* **207**, 521-532.
- Brown J. H., Jardetzky T. S., Gorga J. C., Stern L. J., Urban R. G., Strominger J. L., Wiley, D C. (2015): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **194**, 5-11.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G. (1996): Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **184**, 747-752.
- Delamarre L., Holcombe H., Mellman I. (2003): Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **198**, 111-122.
- Engering A., Geijtenbeek T. B. H., van Vliet S., Wijers M., van Liempt E., Demaurex N., Lanzavecchia A., Fransen J., Figdor C. G., Piguet V., van Kooyk Y. (2002): The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **168**, 2118-2126.
- Foss S., Bottermann M., Jonsson, A., Sandlie I., James L. C., Andersen J. T. (2019): TRIM21- From Intracellular Immunity to Therapy. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* **10**, 2049.
- Gao H., Goncalves C., Gallego T., Francois-Heudeb M., Malarda V., Mateoc V., Lemoinec F., Cendret V., Djedaini-Pilard F., Moreaub V., Pichona Ch., Midouxa P. (2020): Comparative binding and uptake of liposomes decorated with mannose oligosaccharides by cells expressing the mannose receptor or DC-SIGN. *CARBOHYDRATE RESEARCH* **487**, 107877.
- Grommé M., Uytendaele F. G., Janssen H., Calafat J., van Binnendijk R. S., Kenter M. J., Tulp A., Verwoerd D., Neeffjes J. (1999): Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *PNAS* **96**, 10326-10331.
- Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špíšek R. (2017): MHC glykoproteiny – prezentace peptidových fragmentů. In: *Základy imunologie*. Vol. 6, (Kocourková A.), TRITON, Praha, 74-83.
- Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špíšek R. (2017): MHC glykoproteiny – imunitní reakce založené na cytotoxických T lymfocytech. In: *Základy imunologie*. Vol. 6, (Kocourková A.), TRITON, Praha, 145-147.
- Hu W. T., Soper S. A., Jackson J. M. (2019): Time-Delayed Integration Spectral Flow Cytometer (TDI-SFC) for Low-Abundance Cell Immunophenotyping. *ANALYTICAL CHEMISTRY* **91**, 4656-4664.

- Hyun YM.,Choe YH., Park SA., Kim M.(2009): LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. *EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE* **51**, 39
- Chen Y. Y., Liu Y., Song M. J., Lai J. S., Sun J. H., Gong Q. (2020): Molecular polymorphism and expression of MHC I alpha, II alpha, II beta and II invariant chain in the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY* **103**, 103494.
- Ichiyanagi T., Imai T., Kajiwara C., Mizukami S., Nakai A., Nakayama T., Udono H. (2010): Essential Role of Endogenous Heat Shock Protein 90 of Dendritic Cells in Antigen Cross-Presentation. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **185**, 2693-2700.
- Kalantari T., Ciric B., Kamali-Sarvestani E., Rostami A. (2020): Bone marrow dendritic cells deficient for CD40 and IL-23p19 are tolerogenic in vitro. *IRANIAN JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES* **23**, 287-292.
- Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I., (2016): Imunitní systém jako informační soustava. In: Imunologie člověka. Vol. 1, (Buc M., Lokaj J., Jankovičová K., Kondělková K., Hollmanová D.), Garamon s.r.o., Hradec Králové, 32-42.
- Krupka M., Zachova K., Cahlikova R., Vrbkova J., Novak Z., Sebela M., Weigl E., Raska M. (2015):Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice. *IMMUNONOGY LETTERS* **166**, 34-36.
- Kurotaki T., Tamura Y., Ueda G., Oura J., Kutomi G., Hirohashi Y., Sahara H., Torigoe T., Hiratsuka H., Sunakawa H., Hirata K., Sato N. (2007): Efficient cross-presentation by heat shock protein 90- peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **179**,1803-1813.
- Laugel B., Cole K. D., Clement M., Wooldridge L., Price A. D., Sewell K. A. (2011): The multiple roles of the CD8 coreceptor in T cell biology: opportunities for the selective modulation of self-reactive cytotoxic T cells. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **90**, 1089-1099.
- Liu S. Y., Li Q. M., Qiao J. Z., Wang J. F., Cui D. F., Gu K. W., Zhou S. H., Li H. R. (2019):Endothelial IL-8 induced by porcine circovirus type 2 affects dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *VIROLOGY JOURNAL* **16**, 154.
- Lu J. J. G., Ji P., French S. W. (2020): The Major Histocompatibility Complex Class II-CD4 Immunologic Synapse in Alcoholic Hepatitis and Autoimmune Liver Pathology The Role of Aberrant Major Histocompatibility Complex Class II in Hepatocytes. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* **190**, 25-32.
- Matsue H., Yao J., Matsue K., Nagasaka A., Sugiyama H., Aoki R., Kitamura M., Shimada S. (2006):Gap junction mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) isrequired for effective activation of DCs.*JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **176**, 2670-2670.
- Mücksch F., Citir M., Lüchtenborg Ch., Glass B., Kaplan T. A., Schultz C., Brügger B., Kräusslich G. (2019): Quantification of phosphoinositides reveals strong enrichment of PIP2 in HIV-1 compared to producer cell membranes. *SCIENTIFIC REPORTS* **9**, 17661
- Nolan J. P.,Duggan E., Liu E., Condello D., Dave I.,Stoner S. A. (2012):SinglecellanalysisusingsurfaceenhancedRaman scattering (SERS) tags. *METHODS* **57**, 272-279.
- Parker D. C. (2016): T Cell-Dependent B Cell Activation. *ENCYCLOPEDIA OF IMMUNOBIOLOGY* **3**, 175-178.
- Rock K., Shen L. (2005): Cross-presentation: underlyingmechanisms and role in imine surveillance. *IMUNOLOGICAL REVIEWS* **207**, 166-183.
- Romagnoli P., Germain R. N. (1994): The CLIP Region of Invariant Chain Plays a Critical Role in Regulating Major Histocompatibility Complex Class II Folding an peptide occupancy. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **180**, 1107-1113.
- Sánchez-Fueyo A., Whitehouse G., Grageda N., Cramp M. E., Lim T. Y., Romano M., Thirkell S., Lowe K., Fry L., Heward J., Kerr A., Ali J., Chris F., Lewis G., Hope A., Kodela E., Lyne M., Farzaneh F., Kordasti S., Rebollo-Mesa I., Jose Lozano J., Safinia N., Heaton N., Lechler R., Martínez-Llordella M., Lombardi G. (2019): Applicability, safety, and biological

- activity of regulatory T cell therapy in liver transplantation. *AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION* **20**, 1125–1136
- Srivastava P. (2002): INTERACTION OF HEAT SHOCK PROTEINS WITH PEPTIDES AND ANTIGEN PRESENTING CELLS: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **20**, 395-425.
- Stefanie Hoyer S., Prommersberger S., Pfeiffer A. I., Schuler-Thurner B., Schuler G., Dörrie J., Niels Schaft N. (2014): Concurrent interaction of DCs with CD4+ and CD8+ T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **44**, 3543-3559.
- Steinman M. R., Cohn A. Z. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **137**, 1142-1162.
- Tanaka K. (1994): Role of proteasomes modified by interferon- γ in antigen processing. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY* **56**, 571-575.
- Tesmer L. A., Lundy S. K., Sarkar S., Fox D. A. (2008): Th17 cells in human disease. *IMMUNOLOGICAL REVIEWS* **223**, 87-113.
- Tianshu Li T., Zehner M., He J., Próchnicki T., Horvath G., Latz E., Burgdorf S., Takeoka S. (2019): NLRP3 inflammasome-activating arginine-based liposomes promote antigen presentations in dendritic cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE* **14**, 3503-3516
- Virgo P. F., Gibbs G. J. (2012): Flow cytometry in clinical pathology. *ANNALS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY* **49**, 17-28.
- Wang H., Zhang D. F., Han Q., Zhao X., Zeng X., Xu Y., Sun Z., Chen Q. M. (2016): Role of distinct CD4(+) T helper subset in pathogenesis of oral lichen planus. *JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE* **45**, 385-393.
- Wang Y. Y., Hu Ch. F., Li J., You X., Gao G. F. (2016): Increased translocation of antigens to endosomes and TLR4 mediated endosomal recruitment of TAP contribute to nicotine augmented cross-presentation. *ONCOTARGET* **7**, 38451-38466.
- Woodward C. L., Cheng S. N., Jensen G. J. (2015): Electron Cryotomography Studies of Maturing HIV-1 Particles Reveal the Assembly Pathway of the Viral Core. *JOURNAL OF VIROLOGY* **89**, 1267-1277.
- Yang Z., Wang H. Q., Liu A. Z., Gristick H. B., Bjorkman P. J. (2019): Asymmetric opening of HIV-1 Env bound to CD4 and a coreceptor-mimicking antibody. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY* **26**, 1167-+.
- Zachova K., Krupka M., Raska M. (2016): Antigen Cross-Presentation and Heat Shock Protein-Based Vaccines. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS* **64**, 1-18.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC - Alofykocyanin

APC - Antigen presenting cell

CDR - Complementarity-determining regions

CLIP - Class II associated invariant peptide

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol

DC-SIGN - DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

EEA - Early endosome antigen 1

ER - Endoplasmic reticulum

ERAP 1 - Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1

ERAP 2 - Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1

FBS - Fetal bovine serum

FITC -Fluorescein isothiokyanát

Foxp3 - Forkhead Box P3

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HIV - Human Immunodeficiency Virus

ICAM - Intercellular adhesion molecule

Ig - Immunoglobulin

IL - Interleukin

INF- γ - Interferon γ

LFA-1 - lymphocyte function associated antigen 1

LPS - Lipopolysacharid

MHC - Major Histocompatibility komplex

MHC gp 1 - Major Histocompatibility komplex glykoprotein 1

NK - Natural killer

PBS – Phosphate buffered saline

PE - Fykoerythrin

PerCP - Peridinin-chlorofyl-protein

PMT - photomultiplier tube

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

TAP - Transporter associated with antigen processing

TcR - T-cell receptor

TGF- β - Transforming growth factor

TNF- α - Tumor necrosis factor α

TRIM21 - Tripartite Motif-containing protein 21

.