

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Optimalizace *in vitro* metod studia  
adheze leukocytů**

Bakalářská práce

**Michaela Kubíčková**

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař Ph.D.

České Budějovice 2016

Kubíčková, M., 2016: Optimalizace *in vitro* metod studia adheze leukocytů. [Optimalization of *in vitro* methods for studying leukocyte adhesion. Bc. Thesis, in Czech.] – 44 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## Anotace

The aim of this study was to optimize *in vitro* methods for studying leukocyte adhesion and to investigate the influence of selected inhibitors of cysteine and serine proteases present in the saliva of tick *Ixodes ricinus* on leukocyte adhesion.

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

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

V Českých Budějovicích dne.....

.....

Michaela Kubíčková

Poděkování:

Mé poděkování patří především mému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi za odborné vedení, pomoc a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Kotálovi za cenné rady, čas a trpělivost při práci v laboratoři.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratek .....   | 1  |
| 1. Úvod .....  | 2  |
| 1.1 Průběh transmigrace leukocytů .....                                    | 3  |
| 1.1.1 Fáze 1 .....   | 3  |
| 1.1.2 Fáze 2 .....   | 4  |
| 1.1.3 Fáze 3 .....   | 5  |
| 1.2 Adhezivní molekuly - selektiny, integriny a jejich ligandy .....       | 5  |
| 1.2.1 Selektiny a selektinové ligandy .....                                | 6  |
| 1.2.2 Integriny a integrinové ligandy .....                                | 7  |
| 1.3 Chemokiny .....  | 10 |
| 1.3.1 Chemokiny: Struktura, Produkce a Receptory .....                     | 10 |
| 1.3.2 Biologické účinky chemokinů .....                                    | 13 |
| 1.4 Inhibitory adheze .....  | 14 |
| 1.4.1 Exogenní inhibitory .....  | 14 |
| 1.4.2 Endogenní inhibitory .....   | 15 |
| 1.5 Různé metody analýzy leukocytární adheze .....                         | 16 |
| 2. Cíle práce .....  | 17 |
| 3. Materiály a metody .....  | 18 |
| 3.1 Materiály .....  | 18 |
| 3.2 Metody .....   | 19 |
| 3.2.1 Izolace buněk z kostní dřeně .....                                   | 19 |
| 3.2.2 Izolace mononukleárních buněk pomocí gradientu Histopaque 1077 ..... | 19 |
| 3.2.3 Izolace neutrofilů pomocí Percollu .....                             | 20 |
| 3.2.4 Izolace makrofágů z peritonea .....                                  | 21 |
| 3.2.5 Stanovení čistoty buněk pomocí průtokové cytometrie .....            | 21 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.6 | Adheze <i>in vitro</i> .....                           | 21 |
| 3.2.7 | Testované inhibitory .....                             | 22 |
| 3.2.8 | Statistika a vyhodnocení .....                         | 23 |
| 4.    | Výsledky.....  | 24 |
| 4.1   | Optimalizace .....                                     | 24 |
| 4.2   | Měření čistoty buněk pomocí průtokové cytometrie ..... | 27 |
| 4.3   | Testování inhibitorů .....                             | 28 |
| 5.    | Diskuze .....  | 34 |
| 6.    | Závěr.....   | 36 |
|       | Použitá literatura .....                               | 37 |
|       | Seznam obrázků a tabulek .....                         | 44 |

## Seznam použitých zkratk

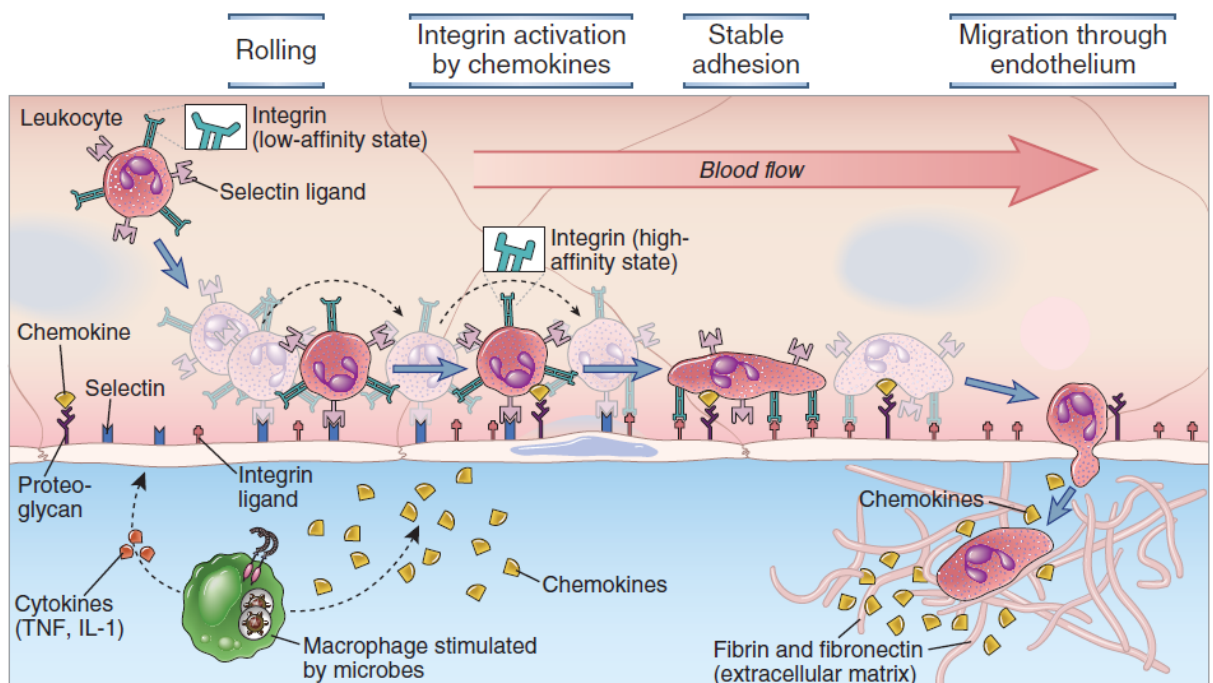
|         |   |
|---------|---|
| CAMs    | cell adhesion molecules                                   |
| Del-1   | developmental endothelial locus 1                         |
| ECM     | extracelulární matrix                                     |
| GDF-15  | growth differentiation factor-15                          |
| GDP     | guanosindifosfát  |
| GTP     | guanosintrifosfát   |
| ICAM 1  | intercellular adhesion molecules 1                        |
| ICAM 2  | intercellular adhesion molecules 2                        |
| IL-1    | interleukin 1   |
| LFA-1   | lymphocyte function-associated antigen 1                  |
| LPS     | lipopolysacharid  |
| MF      | makrofágy   |
| MNN     | mononukleární buňky                                       |
| NF      | neutrofil   |
| NT      | no treatment  |
| PECAM 1 | platelet/endothelial cell adhesion molecule 1             |
| PMA     | phorbol 12-myristate 13-acetate                           |
| PNAd    | peripheral node addressin                                 |
| PSLG 1  | P-selektin glykoprotein ligand 1                          |
| PTX-3   | pentraxin-3   |
| SEM     | standardní chyba průměru (z angl. Standard Error of Mean) |
| sLeX    | tetrasaccharide sialyl Lewis X                            |
| TNF     | tumor necrosis factor                                     |
| VCAM 1  | vascular cell adhesion molekule 1                         |
| VLA-4   | very late antigen 4                                       |

# 1. Úvod

Buněčná adheze je nedílnou součástí mnoha fyziologických procesů spojených také s patologickými stavy probíhajícími v lidském těle. Při představě, že každá tkáň je organizovaným seskupením buněk, které drží pohromadě díky buněčné adhezi, extracelulární matrix, nebo oběma, začínáme chápat důležitost adhezivních vlastností buněk. V tkáních se mezi buňkami navzájem nebo mezi buňkami a extracelulární matrix tvoří spoje (junctions) zprostředkované specifickými adhezivními molekulami, které se nachází na povrchu buněk (Juliano et al., 1993). Funkce buněčné adheze není pouze spojování buněk navzájem nebo zakotvení buněk v daném kompartmentu, ale také zprostředkovává aktivaci buněk, přenos signálu do nitra buňky a komplexní buněčnou odpověď (regulace buněčného cyklu, indukce diferenciací, apoptóza) (Benfield et al., 1984). V případě leukocytární adheze dochází k interakci leukocytu a endotelu cév a následnému přechodu buňky do poškozené tkáně, kde leukocyty provádí fagocytózu a disponují účinnými cytotoxickými mechanismy k zneškodnění patogenních mikroorganismů. Tento proces hraje zásadní roli při zánětu (Ley et al., 2007).

## 1.1 Průběh transmigrace leukocytů

Přechod leukocytů z krve do tkáně (transmigrace) je závislá v první řadě na adhezi leukocytů k endotelovému povrchu post-kapilárních venul a dále na průchodu skrz endotel a základní bazální membránu do tkáně. Zde plní leukocyty svou hlavní úlohu, a tou je zneškodnění mikroorganismů. Tento komplexní proces se skládá z mnoha kroků, při kterých se uplatňují různé typy molekul, jako jsou chemokiny a adherentní molekuly. Stejný systém se uplatňuje u více druhů leukocytů (neutrofilů, monocytů-makrofágů a naivních a efektorových lymfocytů), které pronikají do různých druhů tkání (sekundární lymfoidní orgány, infikovaná tkáň) (Abbas et al., 2012).



**Obrázek 1: Popis transmigrace leukocytů.**

Zdroj: Abbas et al., 2012

### 1.1.1 Fáze 1

V první fázi kaskády leukocytární adheze dochází k **zachycení (capture)** leukocytů na endotelovém povrchu stěny cévy. Zachycení můžeme popsat jako vytvoření prvních molekulárních vazeb mezi cirkulujícím leukocytem a vaskulárním endotelem. Vznik této vazby je při zachycení zprostředkován L-selektiny na povrchu leukocyty. Klíčová je předchozí aktivace endotelu, která způsobí expresi selektinových ligandů na endotelovém povrchu. Selektinové ligandy jsou tvořeny zejména oligosacharidem zvaným sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) (Eriksson et al., 2001; Kunkel et al., 1998).



Následujícím krokem je tzv. **kutálení (rolling)** leukocytů po endotelovém povrchu. Tento proces je také zprostředkovaný selektinovou rodinou transmembránových adhezivních receptorů, které musí být exprimovány na endotelovém povrchu (Kelly et al., 2007). Dochází k pohybu buňky ve směru proudění krve, při kterém je buňka nepřetržitě v kontaktu s cévní stěnou. Při kutálení leukocyt postupně snižuje svou rychlost a tím prodlužuje dobu kontaktu s endotelovým povrchem, chemokiny a jinými aktivačními signály zde přítomnými (Kunkel et al., 1998). Histamin a další mediátory akutního zánětu stimulují přesun P-selektinu z Weibel-Paladových granul na lumen cévy a následně dochází k interakci P-selektinu se selektinovými ligandy nacházejícími se na leukocyty. Nejlépe popsán leukocytární selektinový ligand je tzv. P-selektin glycoprotein ligand 1 (PSGL 1) (McEver et al., 1997).

Rychlost leukocytu se neustále zpomaluje a dochází k tzv. **pomalému kutálení (slow rolling)**. Tento děj je zprostředkovaný E-selektiny, které způsobí částečnou aktivaci integrinů na povrchu leukocytu (Kunkel et al., 1996; Ley et al., 2007).

### 1.1.2 Fáze 2

V další fázi dochází k **aktivaci prostřednictvím chemokinů**. Aktivace je zprostředkována uvolňováním chemokinů, signálních molekul aktivovaných leukocyty při zánětlivé reakci, které způsobuje přilákání leukocytů na základě chemoatrakce. To znamená, že řídí pohyb buněk ve směru chemotaktického gradientu. Pro neutrofile je hlavní chemotaktickou látkou interleukin-8 (IL-8, CXCL8). Pohyb monocytů a eosinofilů při zánětlivé odpovědi je řízen především MIP-1 $\alpha$  a  $\beta$ , MCP-1 a RANTES (CCL3, CCL4, CCL2 a CCL5). Mezi společné chemotaktické látky patří komplementové fragmenty C3a a C5a, lipidové mediátory leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) a faktor aktivující destičky (PAF). Chemotaktické peptidy mohou pocházet i z bakteriálních proteinů, z nichž nejznámější je formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (Hořejší et al., 2013). Aby tento systém fungoval, musí leukocyty na svém povrchu nést chemokinový receptor (typ G protein receptoru). Kontakt chemokinů s chemokinovým receptorem na leukocyty spouští signalizaci v rámci leukocytu, která vede k aktivaci leukocytových integrinů. Integriny tvoří rodinu heterodimerických adhezivních receptorů, které přetrvávají v klidovém stavu v inaktivní konformaci (Hynes et al., 1992). Aktivace integrinů způsobí konformační změnu, která podporuje vazbu na integrinový ligand (Kim et al., 2003). Pokud jsou integriny aktivovány signály přicházejícími od chemokinových receptorů, a to na jedné společné buňce, jedná se o tzv. inside-out integrinovou aktivaci (Muller et al., 2013).

Následuje již samotný krok - **pevná adheze** (firm adhesion). Po aktivaci se integriny na leukocytech váží pevně k jejich ligandům na endotelových buňkách, což vede k úplnému zastavení leukocytu na endotelovém povrchu. Tento proces zajišťují adherentní molekuly (CAMs) integriny, které musí být předem aktivovány prostřednictvím chemokinů, které jsou sekretované leukocyty a endotelovými buňkami. Většina integrinů se váže na proteiny extracelulární matrix. Na leukocytech se vyskytují integriny z  $\beta_2$  (CD18) rodiny, jejichž ligandy jsou exprimovány na endotelových buňkách. Zvláště se vážou na členy imunoglobulinové genové nadrodiny Inter Cellular Adhesion Molecules 1 a 2 (ICAM 1 a ICAM2) (Dustin et al., 1988; Hynes et al., 1992). Lymfocyty a monocyty nesou integriny z  $\alpha_4\beta_1$  rodiny VLA 4, které se vážou na VCAM 1 (Elices et al., 1990; Hakkert et al., 1991). Vazba integrin-CAMs komplexu vede k pevné adhezi leukocytu k endotelovému povrchu.

### 1.1.3 Fáze 3

Ve třetí fázi dochází k **diapedezi**. Adherované leukocyty migrují k nejbližší hranici endotelových buněk v rámci přípravy na extravasaci. Nitrokapilární migrace je zprostředkována leukocytovými integriny a endotelovými adhezivními molekulami, především interakcí mezi Mac-1 (CD11b/CD18) a ICAM-1 (Phillipson et al., 2006; Schenkel et al., 2003). U monocytů je lokomoce podporována např. LFA-1 (beta2alfaA, CD11a/CD18) v kombinaci s ICAM-2 (Schenkel et al., 2003). Diapedéza je proces, při kterém leukocyt transmigruje mezi endotelovými buňkami pomocí améboidního pohybu. Tento děj je na rozdíl od předcházejících fází nevratný (Muller et al., 2007). Může k němu docházet buď na hranicích endotelových buněk (paracelulární transmigrace) nebo dochází k přímému průchodu leukocytu endotelovou buňkou (transcelulární migrace). Diapedéza vyžaduje homofilickou adhezi molekuly na leukocytu interagující se stejnou molekulou na endotelové buňce. Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM 1, CD31) byla objevena jako první molekula zprostředkovávající transmigraci in vitro a in vivo (Bogen et al., 1994; Vaporciyan et al., 1993).

## 1.2 Adhezivní molekuly - selektiny, integriny a jejich ligandy

Mezi adhezivní molekuly patří selektiny, integriny a jejich ligandy. Exprese těchto molekul se liší na základě různých typů leukocytů a částí krevních cév, kde dochází k adhezi (Abbas et al., 2012).

### 1.2.1 Selektiny a selektinové ligandy

Selektiny patří mezi lektiny, což jsou adhezivní molekuly vázající na svou plazmatickou membránu sacharidy. Selektiny zprostředkovávají iniciační krok nízkoafinitní adheze cirkulujících leukocytů k endotelové buněčné stěně postkapilárních venul. Extracelulární domény na povrchu selektinů se podobají C-lektinům, protože vážou sacharidové struktury v závislosti na vápníku. Selektiny a jejich ligandy jsou dle typu exprimovány na leukocytech a endotelových buňkách (Abbas et al., 2012).

U endotelových buněk se setkáváme s dvěma typy selektinů: **P-selektiny** (CD62P) a **E-selektiny** (CD62E).

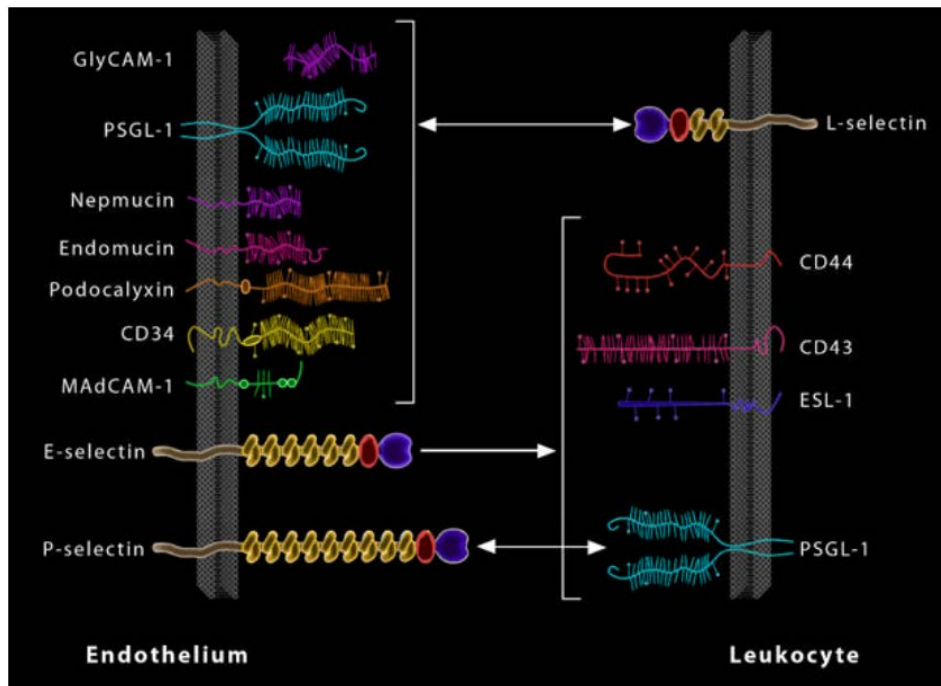
**P-selektiny**, získaly svůj název při prvním objevení v krevních destičkách (platelets), se nacházejí v cytoplazmatických granulích endotelových buněk a jsou v reakci na různé podněty, jako například: mikrobiální produkty, cytokiny, histamin z žírných buněk a trombin, produkovány během krevní koagulace, rychle redistribuovány na povrch buňky (McEver et al., 1989).

**E-selektiny** jsou v reakci na cytokiny: interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis faktor (TNF) a mikrobiální produkty jako lipopolysacharid (LPS) v rámci 1 až 2 hodin syntetizovány a exprimovány na povrchu endotelových buněk (Bevilacqua et al., 1987; Bevilacqua 1989).

Ligandy na leukocytech, které se váží na E- a P-selektiny na endotelových buňkách, jsou komplexní sialové sacharidové skupiny spadající do Lewis X a Lewis A rodiny, přítomné na povrchu různých glykoproteinů na granulocytech, monocytech a aktivovaných efektorových paměťových T lymfocytech (Keelan et al., 1994). Z této skupiny je nejlépe definovaný tzv. tetrasaccharide sialyl Lewis X (sLeX). Jedná se o již dříve zmiňovaný leukocytární membránový glykoprotein známý jako PSGL-1, který je post-translačně modifikovaný, aby navázal karbohydrátové ligandy pro P-selektiny. Několik různých molekul je schopných exprimovat karbohydrátové ligandy pro E-selektiny, zahrnující glykoprotein PSLG-1, E-selektin ligand 1 a některé glykolipidy (Xia et al., 2002; Yang et al., 1999).

Třetí typ selektinů L-selektin (CD62L) je exprimovaný pouze na leukocytech, ne na endoteliálních buňkách. Ligandy pro L-selektiny jsou sialomuciny exprimované na venulách s vysokým endotelem, souhrnně pojmenované jako tzv. peripheral node addressins (PNAd) (Rosen et al., 1993). Významným činitelem vazby L-selektinu na sialomuciny je tzv. sialyl 6-

sulfo Lewis X, který musí být aktivován IL-1, TNF nebo dalšími cytokiny produkovanými v místě zánětu (Mitsuoka et al., 1997).



**Obrázek 2: Selektiny a jejich ligandy.**

Zdroj: Rivera-Nieves et al., 2008

### 1.2.2 Integriny a integrinové ligandy

Integriny jsou povrchové buněčné proteiny s heterodimerickou strukturou, které se skládají ze dvou nekovalentně spojených polypeptidických řetězců, které zprostředkovávají adhezi buněk k jiným buňkám nebo k extracelulární matrix, skrze specifické vazebné interakce s různými ligandy (Hořejší et al., 2013). Existuje více než 30 různých integrinů, všechny mají stejnou základní strukturu zahrnující jeden z více než 15 typů  $\alpha$  řetězců a jeden ze 7 typů  $\beta$  řetězců (Springer and Wang, 2004; Arnaout et al., 2005). Extracelulární globulární konce obou řetězců přispívají ke vzniku vazeb mezi řetězci a k vyváření vazeb mezi ligandy v závislosti na dvojmocných kationtech. Cytoplazmatické domény integrinů interagují s komponentami cytoskeletu, např. vinculin, talin, actin,  $\alpha$ -actinin a trombomyosin. Jméno této rodiny proteinů je odvozené z představy, že koordinují (tj. integrují) signály vznikající při vazbě extracelulárních ligandů s cytoskelet-dependentní motilitou, změnou tvaru a fagocytární odpovědí (Bokel and Brown, 2002).

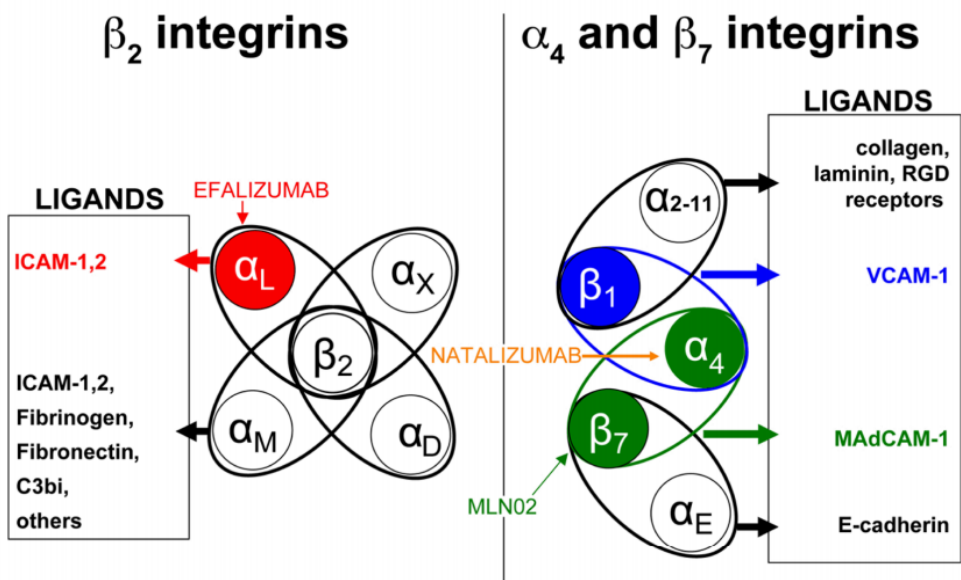
V imunitním systému se vyskytují 2 nejdůležitější integriny, které jsou exprimovány na leukocytech tzv. **LFA-1** (lymphocyte function-associated antigen 1) a **VLA-4** (very late antigen 4) (Hořejší et al., 2012).

Důležitý ligand pro LFA-1 je **Inter Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1, CD54)**, membránový glykoprotein exprimovaný na cytokiny-aktivovaných endotelových buňkách a na různých typech jiných buněk zahrnujících lymfocyty, dendritické buňky, makrofágy, fibroblasty a keratinocyty (van Seventer et al., 1990). Extracelulární část molekuly ICAM-1 je složena z globulárních domén, které sdílejí sekvenční homologii a terciární strukturální rysy domén vyskytujících se v imunoglobulinech (Ig), které se nazývají imunoglobulinové domény. (Mnoho proteinů imunitního systému obsahuje Ig domény, a spadá tak do Ig nadrodiny.) Vazba LFA-1 k ICAM-1 je důležitá pro leukocytárně-endotelové interakce a interakce mezi T-lymfocyty a antigen prezentující buňkou. Dva další ligandy pro LFA-1, spadající do Ig-nadrodiny, jsou ICAM-2 exprimované na endotelových buňkách a ICAM-3 exprimovaný na lymfocytech (van de Stolpe et al., 1996).

VLA-4 se váže k **Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1, CD106)**, což je protein spadající také do Ig nadrodiny, který je exprimovaný na cytokiny-aktivovaných endotelových buňkách různých tkání. Tato interakce je důležitá pro rekrutaci leukocytů do místa zánětu (Kumar et al., 1994).

Další integrin, který se vyskytuje ve vnitřní a adaptivní imunitní odpovědi, je tzv. **Mac-1 (CD11bCD18)**. Nachází se na monocytech a zprostředkovává vazbu na ICAM-1 a adhezi k endotelu. Také funguje jako komplementový receptor, který váže opsonizované částice s produktem komplementové aktivace - inaktivovaným C3b (iC3b) fragmentem, tím zvyšuje fagocytózu mikrobů (Abbas et al., 2012).

*Důležitou vlastností integrinů je jejich schopnost odpovídat na intracelulární signály prostřednictvím rychle se zvyšující afinity k jejich ligandům.* To vede k aktivaci a dochází k tomu při odezvě na signály vznikající při vazbě chemokinů na chemokinový receptor, a v lymfocytech při intracelulárních signálech vznikajících při vazbě antigenu na antigenový receptor. Proces změn ve funkci vazby extracelulárních domén na integrinech, indukovaný intracelulárními signály, se nazývá **inside-out signaling** (Tadokoro et al., 2003).



**Obrázek 3: Integriny a jejich ligandy.**

Zdroj: Rivera-Nieves et al., 2008

Blokování integrinů monoklonálními protilátkami (EFALIZUMAB A NATALIZUMAB) se využívá v terapii autoimunitních onemocnění, jako jsou např. Crohnova choroba a roztroušená skleróza (viz Obrázek 3).

| TABLE 3-1 Major Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules |                               |   |  |
|--|-------------------------------|---|--|
| Family   | Molecule                      | Distribution  | Ligand (molecule; cell type)   |
| Selectin   | P-selectin (CD62P)            | Endothelium activated by cytokines (TNF, IL-1), histamine, or thrombin      | Sialyl Lewis X on PSGL-1 and other glycoproteins; neutrophils, monocytes, T cells (effector, memory) |
|  | E-selectin (CD62E)            | Endothelium activated by cytokines (TNF, IL-1)                              | Sialyl Lewis X (e.g., CLA-1) on glycoproteins; neutrophils, monocytes, T cells (effector, memory)    |
|  | L-selectin (CD62L)            | Neutrophils, monocytes, T cells (naive and central memory), B cells (naive) | Sialyl Lewis X/PNAd on GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1, others; endothelium (HEV)                           |
| Integrin   | LFA-1 (CD11aCD18)             | Neutrophils, monocytes, T cells (naive, effector, memory)                   | ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endothelium (upregulated when cytokine activated)                     |
|  | Mac-1 (CD11bCD18)             | Monocytes, dendritic cells  | ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endothelium (upregulated when cytokine activated)                     |
|  | VLA-4 (CD49aCD29)             | Monocytes, T cells (naive, effector, memory)                                | VCAM-1 (CD106); endothelium (upregulated when cytokine activated)                                    |
|  | $\alpha_4\beta_7$ (CD49dCD29) | Monocytes, T cells (gut homing, naive, effector, memory)                    | VCAM-1 (CD106), MAdCAM-1; endothelium in gut and gut-associated lymphoid tissues                     |

CLA-1, cutaneous lymphocyte antigen 1; GlyCAM-1, glycan-bearing cell adhesion molecule 1; HEV, high endothelial venule; ICAM-1, intracellular adhesion molecule 1; IL-1, interleukin-1; LFA-1, leukocyte function-associated antigen 1; MAdCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule 1; PNAd, peripheral node addressin; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1; TNF, tumor necrosis factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; VLA-4, very late antigen 4.

**Obrázek 4: Přehled selektinů a integrinů.**

Zdroj: Abbas et al., 2012

## 1.3 Chemokiny

Proteiny sekretované například při zánětlivé reakci, které působí jako chemoatraktanty, tj. vysílají signál k buňkám, které mají chemokinové receptory, jako například neutrofilů a monocytů, a ty migrují z krve do infikované tkáně. Cytokiny a chemokiny vylučované aktivovanými leukocyty iniciují proces zánětu. Jedná se o velkou rodinu strukturně homologních cytokinů, které stimulují pohyb leukocytů a regulují jejich přechod z krve do tkáně (Abbas et al., 2012). Vedle zánětu se chemokiny uplatňují i při krvetvorbě, vývoji jednotlivých lymfoidních orgánů a migraci dendritických buněk z místa infekce do lymfatických uzlin.

### 1.3.1 Chemokiny: Struktura, Produkce a Receptory

Je známo kolem 50 lidských chemokinů, z nichž všechny jsou 8 až 12kDa polypeptidy, jejichž řetězce jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky. Tato rozsáhlá skupina chemotaktických cytokinů se dělí do 4 rodin podle množství a umístění cysteinových zbytků na N-terminálním konci. Mezi dvě nejrozsáhlejší chemokinové rodiny se řadí tzv. **CC (někdy také  $\beta$ ) rodina**, ve které cysteinové zbytky sousedí a dále tzv. **CXC (nebo  $\alpha$ ) rodina**, v níž cysteinové zbytky odděluje pouze jedna aminokyselina (Baggiolini et al., 1994; Baggiolini et al., 1997). Toto rozdělení koreluje s organizací nadrodin do jednotlivých genových klastrů. Jen velice malá část chemokinů má pouze jeden cystein, tzv. C rodina, nebo dva cysteiny oddělené třemi aminokyselinami, tzv. CX<sub>3</sub>C. Většina CXC chemokinů a jejich receptorů zprostředkovává rekrutaci neutrofilů a lymfocytů a většina CC chemokinů a jejich receptorů se stará o rekrutaci monocytů a lymfocytů (Abbas et al., 2012)

Chemokiny z CC a CXC rodiny jsou produkovány leukocyty a různými typy tkáňových buněk, jako například endotelovými buňkami, epiteliálními buňkami a fibroblasty. Ve většině těchto buněk je sekrece chemokinů indukovaná rozpoznáním mikrobů pomocí různých buněčných receptorů, které jsou součástí vnitřního imunitního systému. Cytokiny, které hrají důležitou roli při zánětu tzv. IL-1 a TNF, také indukují produkci chemokinů. Některé CC chemokiny jsou také produkovány antigenem stimulovanými T buňkami, což dokazuje vazbu mezi adaptivní imunitou a rekrutací zánětlivých leukocytů (Tessier et al., 1997).

*Chemokinové receptory patří do skupiny proteinů, která obsahuje sedm alfa-helixových transmembránových domén s přilehlými smyčkami a navázaným guanosin trifosfátem (GTP) - tyto receptory patří do rodiny (G) protein-coupled receptor (GPCR) (Loetscher et al., 2000; Thelen et al., 2001).*

Tyto receptory iniciují intracelulární odpověď pomocí asociace trimetrických G proteinů. V klidovém stavu buňky tvoří s receptorem asociované G proteiny, stabilní inaktivní komplex, který zahrnuje guanosine difosfát (GDP) navázaný na  $G\alpha$  podjednotku. Obsazení receptoru ligandem vede k přeměně GDP na GTP. GTP vázaná forma G proteinu aktivuje mnoho buněčných enzymů, jako například isoformu fosfatidilinositol-specifické fosoflipázy C, která svou funkcí zvyšuje intracelulární hladinu kalcia a aktivuje protein kinasu C. G protein stimuluje cytoskeletární změny a polymerizaci aktinových a myozinových vláken, což vede k zvýšení buněčné motility (Rolling el.al., 1997). Tyto signály následně způsobují změnu konformace integrinů na povrchu buňky a zvyšují afinitu integrinů k jejich ligandům. Exprese chemokinových receptorů je výrazně snížena působením chemokinů a to je pravděpodobně mechanismus způsobující ukončení odpovědi (Lodowski el al., 2009).

***Více než 17 odlišných chemokinových receptorů může vytvářet variabilní kombinace, které jsou exprimovány na rozdílných typech leukocytů, což vede k různým způsobům aktivace buněk*** ( Neoto el al., 1993).

Je známo deset odlišných receptorů pro CC chemokiny , šest pro CXC chemokiny a jeden pro CX<sub>3</sub>CL1 chemokiny. Chemokinové receptory jsou exprimovány na všech leukocytech, s největším počtem a variabilitou na T buňkách (Islam el al., 2012). Receptory vykazují překrývající se specifitu pro chemokiny v rámci každé rodiny a jednotlivý vzor buněčné exprese receptoru určuje, jaký buněčný typ bude odpovídat na určitý chemokin. Stojí za zmínku, že určité chemokinové receptory, konkrétně CCR5 a CXCR4, se chovají jako ko-receptory pro lidský imunodeficientní virus (HIV). Některé aktivované T lymfocyty vylučují chemokiny, které se vážou k CCR5 a blokuje infekci virem HIV (Loetscher et al., 2000; Opperman el al., 2004).



| <b>TABLE 3–2 Chemokines and Chemokine Receptors</b> |                      |                           |  |
|---|----------------------|---------------------------|--|
| <b>Chemokine</b>                                    | <b>Original Name</b> | <b>Chemokine Receptor</b> | <b>Major Function</b>  |
| <b>CC chemokines</b>                                |                      |                           |  |
| CCL1  | I-309                | CCR8                      | Monocyte recruitment and endothelial cell migration                          |
| CCL2  | MCP-1                | CCR2                      | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL3  | MIP-1 $\alpha$       | CCR1, CCR5                | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL4  | MIP-1 $\beta$        | CCR5                      | T cell, dendritic cell, monocyte, and NK recruitment; HIV coreceptor         |
| CCL5  | RANTES               | CCR1, CCR3, CCR5          | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL7  | MCP-3                | CCR1, CCR2, CCR3          | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL8  | MCP-2                | CCR3, CCR5                | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL9/CCL10  |                      | CCR1                      |  |
| CCL11   | Eotaxin              | CCR3                      | Eosinophil, basophil, and T $\mu$ 2 recruitment                              |
| CCL12   | Unknown              | CCR2                      | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL13   | MCP-4                | CCR2, CCR3                | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL14   | HHC-1                | CCR1, CCR5                |  |
| CCL15   | MIP-1 $\delta$       | CCR1, CCR3                | Mixed leukocyte recruitment  |
| CCL16   | HHC-4                | CCR1, CCR2                |  |
| CCL17   | TARC                 | CCR4                      | T cell and basophil recruitment  |
| CCL18   | DC-CK1               | ?                         | Lymphocyte and dendritic cell homing   |
| CCL19   | MIP-3 $\beta$ /ELC   | CCR7                      | T cell and dendritic cell migration into parafollicular zones of lymph nodes |
| CCL20   | MIP-3 $\alpha$       | CCR6                      |  |
| CCL21   | SLC                  | CCR7                      | T cell and dendritic cell migration into parafollicular zones of lymph nodes |
| CCL22   | MDC                  | CCR4                      | T cell and basophil recruitment  |
| CCL23   | MPIF-1               | CCR1                      |  |
| CCL24   | Eotaxin-2            | CCR3                      | Eosinophil, basophil, and T $\mu$ 2 recruitment                              |
| CCL25   | TECK                 | CCR9                      | Astrocyte migration  |
| CCL26   | Eotaxin-3            | CCR3                      | Eosinophil, basophil, and T $\mu$ 2 recruitment                              |
| CCL27   | CTACK                | CCR10                     | Dermal cell migration  |
| CCL28   | MEC                  | CCR10                     | Dermal cell migration  |
| <b>CXC chemokines</b>                               |                      |                           |  |
| CXCL1   | GRO $\alpha$         | CXCR2                     | Neutrophil recruitment   |
| CXCL2   | GRO $\beta$          | CXCR2                     | Neutrophil recruitment   |
| CXCL3   | GRO $\gamma$         | CXCR2                     | Neutrophil recruitment   |
| CXCL4   | PF4                  | CXC3B                     | Platelet aggregation   |
| CXCL5   | ENA-78               | CXCR2                     | Neutrophil recruitment   |
| CXCL6   | GCP-2                | CXCR1, CXCR2              | Neutrophil recruitment   |
| CXCL7   | NAP-2                | CXCR2                     | Neutrophil recruitment   |
| CXCL8   | IL-8                 | CXCR1, CXCR-2             | Neutrophil recruitment   |
| CXCL9   | Mig                  | CXCR3                     | Effector T cell recruitment  |
| CXCL10  | IP-10                | CXC3, CXCR3B              | Effector T cell recruitment  |
| CXCL11  | I-TAC                | CXC3                      | Effector T cell recruitment  |
| CXCL12  | SDF-1 $\alpha\beta$  | CXCR4                     | Mixed leukocyte recruitment; HIV coreceptor                                  |
| CXCL13  | BCA-1                | CXCR5                     | B cell migration into follicles  |
| CXCL14  | BRAK                 |                           |  |
| CXCL16  | —                    | CXCR5                     | CXCL16   |
| <b>C chemokines</b>                                 |                      |                           |  |
| XCL1  | Lymphotactin         | XCR1                      | T cell and NK cell recruitment   |
| XCL2  | SCM-1 $\beta$        | XCL1                      |  |
| <b>CX<math>_3</math>C chemokines</b>                |                      |                           |  |
| CX $_3$ CL1   | Fractalkine          | CX $_3$ CR1               | T cell, NK cell, and macrophage recruitment; CTL and NK cell activation      |

**Obrázek 5: Přehled chemokinů a chemokinových receptorů.**

Zdroj: Abbas et al., 2012

### 1.3.2 Biologické účinky chemokinů

Některé chemokiny jsou produkovány leukocyty a dalšími buňkami při odpovědi na vnější stimul a jsou součástí zánětlivé odpovědi, jiné jsou zase produkovány v tkáních a hrají roli v tkáňové organizaci. Chemokiny byly objeveny jako chemoatraktanty pro leukocyty, to je také jejich nejdůležitější funkce (Fernandez et al., 2002).

Chemokiny jsou esenciální pro rekrutaci cirkulujících leukocytů z cév do extravaskulární lokality. Leukocytární rekrutace, která zahrnuje naivní lymfocyty vstupující do lymfatických uzlin skrz venuly s vysokým endotelem, a efektorové lymfocyty, monocyty a neutrofile vstupující do místa infekce v tkáních, je řízena aktivitou několika chemokinů. Chemokiny produkované ve tkáních se vážou na heparansulfát proteoglykany na endotelových buňkách, které leží na postkapilárních venulách a jsou vystavovány cirkulujícím leukocytům navázaným na endotelovém povrchu pomocí interakcí s adherentními molekulami. Vystavení buněk na endotelovém povrchu způsobuje zvýšenou lokální koncentraci chemokinů, které se vážou na chemokinové receptory na leukocytech. Signály z chemokinových receptorů iniciují zvýšení integrinové afinity, což vede k pevné adhezi leukocytů, což je zásadní krok pro migraci leukocytů z cév do tkáně. Různé chemokiny působí na různých buňkách a ve spolupráci s adhezivními molekulami společně kontrolují zánětlivý infiltrát (Moser et al., 2004).

Extravaskulární chemokiny stimulují pohyb leukocytů a jejich migraci k chemickému gradientu sekretovaných proteinů tzv. proces chemokineze. V takovém případě mohou být leukocyty řízeny směrem k infikovaným buňkám v tkáni nebo k jednotlivým regionům v lymfatických orgánech (Petrie et al., 2009).

Chemokiny hrají svou roli také při vývoji jednotlivých lymfoidních orgánů a řídí pohyb lymfocytů a leukocytů skrz periferní lymfoidní tkáň (Nagasawa et al., 1996).

Chemokiny jsou důležité při migraci dendritických buněk z místa infekce do lymfatické uzliny. Dendritické buňky hrají klíčovou roli při přemostění vrozené a získané imunity. Využívají různé receptory k rozpoznání a reakci na mikroby v periferní tkáni a dále migrují do lymfatických uzlin, aby předaly informaci o přítomnosti infekce T lymfocytům (Dieu et al., 1998).

## 1.4 Inhibitory adheze

Inhibitory adheze lze charakterizovat jako látky nebo molekuly různého typu, které zpomalují nebo přímo zabraňují adhezi. To znamená, že negativně regulují určitý krok kaskády adheze leukocytů.

### 1.4.1 Exogenní inhibitory

Mezi exogenní inhibitory patří například sloučeniny obsažené v léčících. Existuje pravděpodobnost, že některé látky vylučované parazity, mohou patřit do této skupiny, jako například klíštěcí inhibitory proteáz, které jsou popsány níže.

#### **Inhibice adheze prostřednictvím NSAID**

Některé léky ze skupiny NSAID, jako například indomethacin, diclofenac, ketoprofen, aspirin, aceclofenac, kyselina mefenamová a kyselina flufenamová silně tlumí adhezi neutrofilů k endotelovému povrchu *in vitro* a též *in vivo*. Dochází k tomu za podmínek napodobujících kutálení (rolling) zprostředkované selektiny v rámci kaskády adheze leukocytů. K tomuto efektu dochází v důsledku prudkého poklesu exprese L-selektinů na povrchu neutrofilů. Ostatní adhezivní molekuly nejsou ovlivněny, jedná se tedy o efekt specifický pouze pro L-selektiny (Díaz-González et al., 1995).

#### **Klíštěcí inhibitory proteáz**

V rámci předkládané práce bylo testováno několik inhibitorů proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus* na jejich aktivitu inhibující adhezi leukocytů. Jedná se o několik členů z rodiny cystatinů a serpinů. Tyto dvě proteinové rodiny se nevyskytují pouze u klíšťat, ale také u obratlovců, bezobratlých, prvoků a rostlin (Vray et al., 2002; Turk et al., 2008). Jsou zahrnuty v regulaci rozsáhlého množství různých biologických procesů, jako například v imunitní odpovědi a homeostázi (Reddy et al., 1995; Honey and Rudensky, 2003, Wille et al., 2004).

**Cystatiny** tvoří rozsáhlou nadrodinu vrátně a těsně se vázajících inhibitorů, které slouží jako přirozená kontrola aktivity cysteinových proteáz a legumainů (Abrahamson et al., 2003). Základní struktura cystatinu je tvořena pěti vlákny  $\beta$ -listů omotanými kolem jednoho centrálního  $\alpha$ -helixu. Fungují jako reverzibilní kompetitivní inhibitory cysteinových proteáz (Turk et al., 1991).

**Serpiny** představují nadrodinu proteinů se strukturní homologií, která je tvořena třemi  $\beta$  listy a 8-9  $\alpha$  helixy. Typickým znakem serpinu je tzv. reakční centrální smyčka (RCL), která při interakci s proteázou tvoří čtvrté vlákno. Tato změna konformace představuje přechod z napnutého (stressed) do uvolněného (relaxed) stavu a slouží k cílené inhibici proteáz (Elliot et al., 1996). Interakce mezi serpinem a proteázou sebou nese nevratnou změnu a následně ztrátu původní funkce pro obě molekuly.

## **1.4.2 Endogenní inhibitory**

### **Developmental endothelial locus-1 (Del-1)**

Del-1 vzniká jako produkt endotelu exprimovaný v mnoha tkáních (např. plíce, ledviny, dásně, oko, mozek) a působí jako inhibitor leukocytární adheze. Váže se specificky k  $\beta 2$ -integrinu LFA-1, přesto že působí antagonisticky. Imobilizovaný Del-1 sice zprostředkuje LFA-1 dependentní leukocytární vazbu za statických podmínek, ale Del-1/LFA-1 interakce je velice slabá, a tak neumožňuje post-adherentní zpevnování této vazby, které umožňují integrinové ligandy (Choi et al., 2008).

### **Pentraxin-3 (PTX-3)**

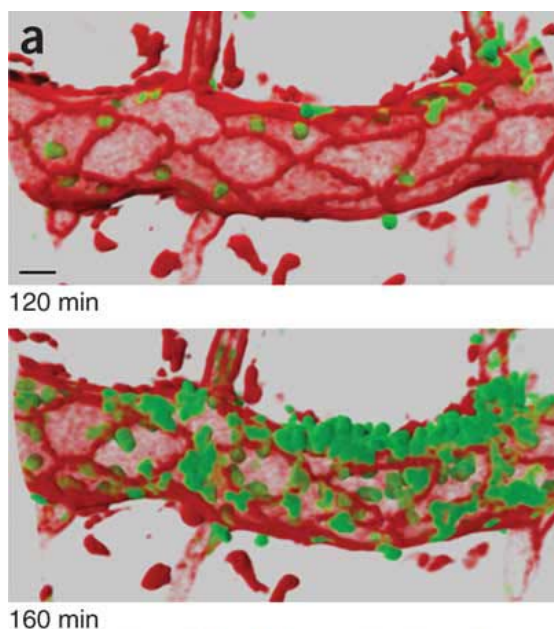
PTX-3 je produkován zánětlivými buňkami a mezi jeho funkce patří rozpoznání a opsonizace patogenu. Během těchto procesů kooperuje s komplementem a zároveň reguluje jeho funkci (Deban et al., 2010; Cotena et al., 2007). Bylo prokázáno, že C-terminální konec PTX-3 interaguje s P-selektiny a jejich společná vazba je závislá na glykosylaci PTX-3. Pokud k ní dojde, dochází ke kompetitivní interferenci s vazbou P-selektin/PSGL-1, což způsobí zablokování procesu kutálnění v kaskádě adheze leukocytů (Cotena et al., 2007).

### **Growth differentiation factor-15 (GDF-15)**

GDF-15 je členem TGF-beta rodiny a blokuje chemokiny vyvolanou aktivaci leukocytů, integrinovou afinitu a také integrin-dependentní leukocytární adhezi k ICAM-1 a VCAM-1 (Kempf et al., 2011). GDF-15 se tvoří v mnoha tkáních, např. v srdci. Poškození tkáně při infarktu myokardu zvyšuje jeho expresi v kardiomyocytech a snižuje rozsah myokardu (Kempf et al., 2006)

## 1.5 Různé metody analýzy leukocytární adheze

Existuje mnoho různých systémů, ve kterých lze adhezi zkoumat. Experimentálně existují tyto systémy **statické**, v nichž dochází k adhezi buď k proteinům extracelulární matrix, jako např. k fibronektinu, lamininu, kolagenu, nebo k endotelovým buňkám v jamkách kultivačního panelu. Stupeň adheze se měří fluorimetricky, intracelulárním značením buněk fluorescenčními sondami. K rozlišení signálů přicházejících od endotelových buněk je nutné jako kontrolu měřit fluorescenci v jamkách, do kterých nebyly přidány leukocytární buňky (Ma et al., 2008). Další možností je zkoumání adheze ve fluidních systémech, mezi které můžeme zařadit několik paralelních průtokových modelů. V těchto modelech jsou buňky vystaveny tzv. **smykovému napětí (shear stress)** a dochází zde k proudění živného média, což významně ovlivňuje funkci endotelových buněk a adhezi cirkulujících leukocytů (Resnick et al., 2003; Lawrence et al., 1997). Mezi takovéto systémy patří například komůrka s otvory pro přítok a odtok média, na jejímž dně se nachází sklo předem ošetřené některou ze složek extracelulární matrix a pokryté endotelovými buňkami. Do komůrky je pumpou vtlačeno médium obsahující zkoumanou buněčnou populaci a mikroskopicky se hodnotí adheze k endotelovým buňkám při různých hodnotách smykového napětí (Cucullo et al., 2011). Dále lze experimentální přístupy dělit na zkoumání izolované živé kultury buněk tedy *in vitro* nebo přímo v živém organismu *in vivo* pomocí intravitálního mikroskopu. (Wickoff et al., 2000; Masedunskas et al., 2012)



**Obrázek 6: Zobrazení leukocytární adheze a transmigrace v intravitálním mikroskopu.**

Zdroj: Woodfin et al., 2011

## 2. Cíle práce

Cílem této práce je:

1. Optimalizovat metody adheze leukocytů k adhezivním proteinům či proteinům extracelulární matrix
2. Pomocí těchto optimalizovaných metod zanalyzovat vliv klíčících inhibitorů proteáz na adhezi leukocytů

## 3. Materiály a metody

### 3.1 Materiály

Tabulka 1: Přehled použitých materiálů.

| JMÉNO  | POPIS  | FIRMA          |
|--|--|----------------|
| Antibiotics (ATB)                                | Penicillin Streptomycin  | Biosera        |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                       | Bovine Serum Albumin 30 % liquid   | Biosera        |
| Bovine Serum Albumine free fatty acids (BSA ffa) | Bovine Serum Albumine free fatty acids 5G                                      | Sigma-Aldrich  |
| Calcein  | Calcein-2AM  | Sigma-Aldrich  |
| CD11b  | FITC Rat Anti-Mouse CD11b Clone M1/70 RUO                                      | BD Pharmingen™ |
| Collagen   | Collagen from rat tail   | Sigma-Aldrich  |
| Fibronectin                                      | Fibronectin from human plasma  | Sigma-Aldrich  |
| FACS pufr  | 0,5 l PBS + 1%BSA + 0,1%NaN <sub>3</sub> (azid sodný)                          | Sigma-Aldrich  |
| Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS)             | Hanks´ Balanced Salt Solution 10x 500ml  | Biosera        |
| Histopaque-1077                                  | Histopaque-1077  | Sigma-Aldrich  |
| Klíštěcí inhibitory proteáz:<br>G1,G2,G9,S8K     | G1, G2, G9, S8K  | Mgr. Jan Kotál |
| Laminin  | Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane            | Sigma-Aldrich  |
| Ly-6G  | PE Rat Anti-Mouse Ly-6G Clone 1A8 RUO  | BD Pharmingen™ |
| Médium<br>RPMI+10%BOFES+ATB+GL+ME                | RPMI 1640 + 1% ATB +10% Fetal Bovine Serum Premium + 0.1% Mercaptoethanol 50nm | Biosera        |
| Myši   | C57B1/6N   | Velaz          |
| PBS  | 10x Dubecco´s Phospate Buffered Saline+Cell Culture Water Pyrogene Free        | Biosera        |
| Percoll™   | Percoll™   | G&E Healthcare |
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)            | Phorbol 12-myristate 13-acetate  | Sigma-Aldrich  |
| Red Blood Cells Lysis Buffer (RBC Lysis Buffer)  | Red-Blood-Cells Lysis Buffer   | eBioscience    |
| RPMI 1640  | RPMI 1640 w/ stable Glutamine w/ 25 mM Hepes                                   | Biosera        |
| Cell Culture Water                               | Cell Culture Water Pyrogene Free   | Biosera        |

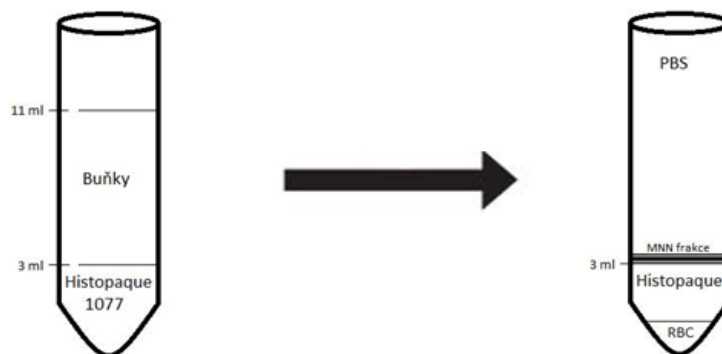
## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace buněk z kostní dřeně

Buňky kostní dřeně jsem izolovala z femuru a tibie myši, kterou jsem usmrtila zlomením vazy (cervikální dislokací). Kosti jsem jednotlivě promyla pomocí injekční stříkačky naplněné médiem do 50ml centrifugační zkumavky. Následně jsem získaný roztok přefiltrovala přes cell-strainer, aby byl roztok buněk zbaven úlomků kostí a dalších nežádoucích elementů. Přefiltrovaná suspenze buněk v 50ml centrifugační zkumavce byla centrifugována 5 minut při 250 g v 5°C v centrifuze s výkyvným rotorem. Vzniklý supernatant jsem odlila ze zkumavky a pelet rozsuspendovala. K roztoku buněk jsem přidala 0,5 ml Red-Blood-Cell Lysis Bufferu a po 30 sekundách lyze erytrocytů jsem roztok naředila pomocí PBS do 15 ml (PBS je isotonické, zablokuje lyzi dalších buněk). Následovalo promytí od Red-Blood-Cell Lysis Bufferu pomocí centrifugy na 5 minut při 250 g. Po odlití supernatantu jsem promytí ještě jednou zopakovala.

### 3.2.2 Izolace mononukleárních buněk pomocí gradientu Histopaque 1077

Vyizolované buňky kostní dřeně jsem rozsuspendovala v 8 ml PBS. Následovala příprava hustotního gradientu na izolaci mononukleárních buněk. Použila jsem 3 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), který měl pokojovou teplotu. Histopaque 1077 jsem napipetovala do 15ml centrifugační zkumavky a následně jsem opatrně pomocí serologické pipety (režim gravitace) převrstvila Histopaque 1077 roztokem buněk. Zkumavku s gradientem jsem nechala centrifugovat v centrifuze s výkyvným rotorem 30 minut při 400 g, zrychlení 3, zpomalení 1. Mononukleární frakce se oddělí v podobě dvou vrstev buněk, které jsem odsála pomocí mikropipety.



Obrázek 7: Schéma izolace mononukleárních buněk na hustotním gradientu.



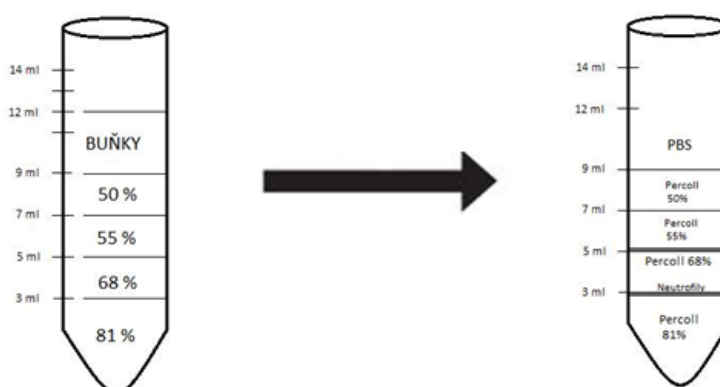
### 3.2.3 Izolace neutrofilů pomocí Percollu

Vyizolované buňky kostní dřeně jsem rozsuspendovala ve 3 ml PBS. Následně jsem připravila Percoll o různých koncentracích. 100% Percoll jsem připravila smícháním 3 ml 10x koncentrovaného PBS a 27 ml zásobního Percollu. Ten jsem dále ředila s 1x PBS podle následující tabulky na konečné koncentrace 81%, 68%, 55% a 50% Percoll. (Tabulka 2 a Obrázek 8)

**Tabulka 2: Ředění Percollu.**

|                    | <b>100% PERCOLL</b> | <b>1xPBS</b> |
|--------------------|---------------------|--------------|
| <b>81% Percoll</b> | 8,1 ml              | 1,9 ml       |
| <b>68% Percoll</b> | 6,8 ml              | 3,2 ml       |
| <b>55% Percoll</b> | 5,5 ml              | 4,5 ml       |
| <b>50% Percoll</b> | 5,0 ml              | 5,0 ml       |

Do 15 ml centrifugační zkumavky jsem jednotlivě navrstvila různé koncentrace Percollu. Nejdříve byly nepipetovány 3 ml 81%, dále po 2 ml 68%, 55% a 50% Percollu a na závěr 3ml roztoku buněk PBS. Bylo důležité pracovat se serologickou pipetou v režimu gravitace, aby se vrstvy navzájem nepromíchaly a bylo zachováno rozhraní mezi jednotlivými vrstvami. Následovala centrifugace 30 minut při 1200 g, zrychlení 3, zpomalení 1 provedená ve výkyvném rotoru. Frakce neutrofilů se oddělila v podobě vrstvy buněk na rozhraní 81% a 68%. Buňky jsem odsála pomocí mikropipety.



**Obrázek 8: Schéma izolace neutrofilů na hustotním gradientu.**

### **3.2.4 Izolace makrofágů z peritonea**

Myši byly 72 hodin před izolací makrofágů intraperitoneálně injikovány 1 ml thioglykolátového média. Těsně před izolací byla myš usmrčena zlomením vazů. Do peritonea jsem zavedla 2 injekční stříkačky, které obsahovaly každá po 6 ml PBS. PBS jsem střídavě vytlačovala do peritonea a zpět nasávala. Takto jsem postupovala, dokud nebylo peritoneum myši řádně promyté. Získaný roztok obsahující makrofágy jsem umístila do 50ml centrifugační zkumavky, tu jsem centrifugovala ve výkyvném rotoru 5 minut při 250 g. Následně jsem odlila supernatant a pelet rozsuspendovala. Dále jsem 30 sekund nechala lyzovat erytrocyty pomocí 0,5 ml Red-Blood-Cell Lysis Bufferu. Po 30 sekundách jsem roztok naředila pomocí PBS do 10 ml a dvakrát promyla pomocí centrifugy na 5 minut při 250 g. Finální pelet buněk jsem rozsuspendovala v 5 ml média RPMI + 0,5% BSA + 1% ATB a roztok jsem uložila na led.

### **3.2.5 Stanovení čistoty buněk pomocí průtokové cytometrie**

Z celkového množství vyizolovaných buněk jsem odebrala vzorek o objemu 100  $\mu$ l, který jsem smíchala se 100  $\mu$ l FACS pufru. Vzorek jsem rovnoměrně rozdělila po 100  $\mu$ l do 2 zkumavek. První zkumavka sloužila pouze jako negativní kontrola, tudíž jsem do ní nepřidávala žádné protilátky. Do druhé zkumavky jsem přidala protilátky CD11b (značí myeloidní buňky) a Ly-6G (značí neutrofile). Následně jsem oba vzorky dala na 30 minut do lednice a poté promyla přidáním 1 ml FACS pufru a centrifugací 5 minut při 250 g. Tento krok jsem ještě jednou zopakovala a vzniklý pelet rozsuspendovala ve 100  $\mu$ l FACS pufru.

Následně byla čistota vyizolovaných buněk změřena pomocí BD FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) a analyzována v programu BD FASC Diva Software. Jako první byl měřen kontrolní vzorek bez protilátek, který sloužil k stanovení negativní kontroly pro měření vzorku obsahujícího protilátky. Vygenerované výsledky pomocí BD FASC Diva Softwaru jsem následně použila na vyhodnocení čistoty neutrofilů.

### **3.2.6 Adheze *in vitro***

24 hodin před každým experimentem byl proveden tzv. coating destičky (costar 3590-96 well EIA/RIA Plate) testovanými proteiny extracelulární matrix (fibronectinem, lamininem a kolagenem). Do jamek 96 jamkové destičky bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku ligandů pro leukocytární integriny v různých koncentracích (viz bod 4.1 výsledky).

Po vyizolování konkrétního typu buněk (mononukleární buňky, makrofágy, neutrofile) jsem zjistila počet buněk v daném množství média. Na experiment bylo potřeba ideálně 20 000 buněk

na jamku v 96 jamkové destičce. Podle počtu testovaných vzorků a potřebných opakování byl odebrán určitý počet buněk +10%, který byl následně inkubován 20 minut s fluorescenčním značením (Calcein-2AM) v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následovalo rozdělení buněk do určitého počtu testovaných vzorků a pre-inkubace s inhibitory 1-2 hodiny (viz bod 4.3 výsledky). Podle délky pre-inkubace jsem si připravila 96 jamkovou destičku tak, že jsem jednotlivé jamky nechala vyblokovat pomocí 100 µl 3% BSA na 1 hodinu před adhezí *in vitro* (viz tabulka 3 protokol B). Poté byly buňky pre-inkubovány 20 minut s PMA o různých koncentracích (viz bod 4.1 výsledky), což mělo sloužit k aktivaci buněk. Pre-inkubace probíhaly pouze v 0,5 ml roztoku (viz tabulka 3 protokol B), až těsně před rozdělením do destičky byly jednotlivé testované vzorky doředy na potřebný objem, promíchány a rozděleny do destičky. Následovala inkubace 1 hodinu a měření ve fluorimetru. První měření bylo bez promytí a následovalo 5 promytí pomocí 100 µl PBS.

V průběhu serie experimentů přestal pokus fungovat a tak byl zaveden nový protokol (viz tabulka 3, protokol B), poskytnutý Dr. Kyoung-Jin Chungem z laboratoře Prof. Triantafyllose Chavakise (Technická univerzita v Drážďanech). Postup adheze *in vitro* byl tedy prováděn podle dvou různých protokolů. Rozdíly v jednotlivých krocích jsou znázorněny v tabulce 3.

**Tabulka 3: Porovnání protokolu A a B.**

| <b>PROTOKOL A</b>                           | <b>PROTOKOL B</b>                        |
|---|--|
| -   | vyblokování destičky 3% BSA 1 hod.       |
| preinkubace v celkovém objemu               | pre-inkubace s inhibitory a PMA v 0,5 ml |
| BSA   | BSA free fatty acids                     |
| inkubace v destičce 1 hod.                  | inkubace v destičce 20 min.              |
| inkubace s calceinem v PBS                  | inkubace s calceinem v HBSS              |
| inkubace buněk v médiu RPMI+1% ATB+0,3% BSA | inkubace buněk v médiu RPMI+0,1% BSA     |
| PMA= 200 ng/ml                              | PMA= 50 ng/ml                            |

### 3.2.7 Testované inhibitory

V rámci série experimentů testujících adhezi *in vitro* jsem testovala několik klíčících inhibitorů proteáz na jejich aktivitu inhibující adhezi. Tyto proteiny byly vyrobeny v laboratoři Dr. Michaila Kotsyvakise Mgr. Janem Kotálem a následně firmou ARVYS PROTEINS (Trumbull, USA) zbaveny LPS.

**Tabulka 4: Přehled testovných inhibitorů klíčících proteáz.**

| <b>NÁZEV</b> | <b>TYP INHIBITORU</b> | <b>KONCENTRACE STOCK</b> |
|--------------|-----------------------|--------------------------|
| G1           | cystatin              | 343 $\mu\text{M}$        |
| G2           | cystatin              | 458,7 $\mu\text{M}$      |
| G9           | cystatin              | 129,9 $\mu\text{M}$      |
| S8K          | serpin                | 58,3 $\mu\text{M}$       |

### **3.2.8 Statistika a vyhodnocení**

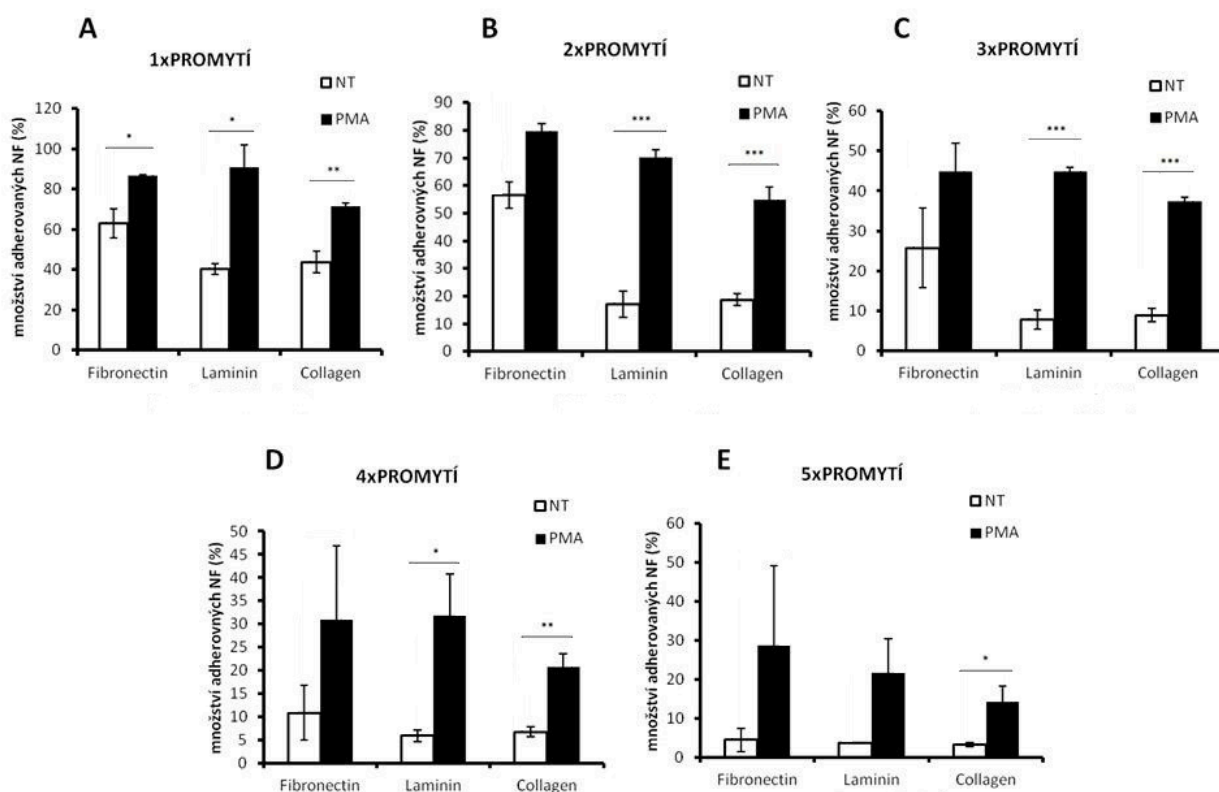
Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel, v jednotlivých souborech, které vygeneroval program Gene5/2,05 v rámci fluorimetrického měření na přístroji SYNERGY H1 microplate reader od firmy BioTek (Winooski, USA). Nejdříve byl vypočítán podíl adherovaných buněk v procentech. Následně byly stanoveny průměry z jednotlivých kvadruplikací a z nich vycházející standardní chyby průměru. Data jsou zobrazena v grafech. Statistickou významnost výsledků jsem ověřila pomocí Studentova  $t$  testu v programu Microsoft Office Excel.

## 4. Výsledky

### 4.1 Optimalizace

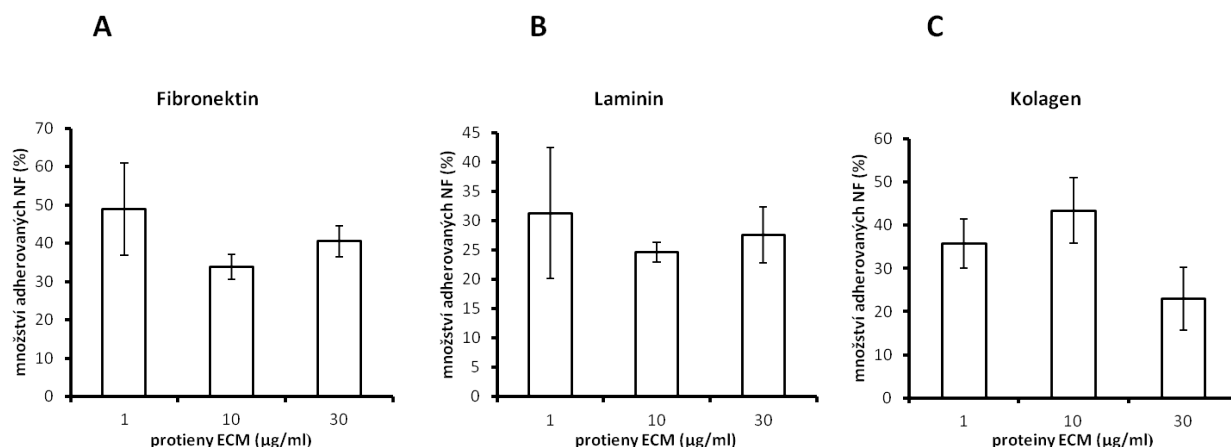
Cílem těchto experimentů bylo stanovit optimální podmínky pro testování statické adheze *in vitro*.

První krok optimalizace zahrnoval výběr správného počtu promytí, kdy bylo množství adherovaných neutrofilů, aktivovaných pomocí PMA, nejsilnější a zároveň zřetelný rozdíl vůči negativní kontrole. Na základě vyhodnocení jednotlivých promytí (Obr. 9A-E) bylo jako optimální vybráno 2x promytí (Obr. 9B) a 3x promytí (Obr. 9C). Vzhledem k výraznějším rozdílům mezi negativní kontrolou a aktivací u všech proteinů ECM v 3x promytí bylo určeno jako neoptimálnější a směrodatné při vyhodnocování ostatních optimalizačních experimentů, přestože bylo v každém experimentu prováděno a měřeno všech 5 promytí.



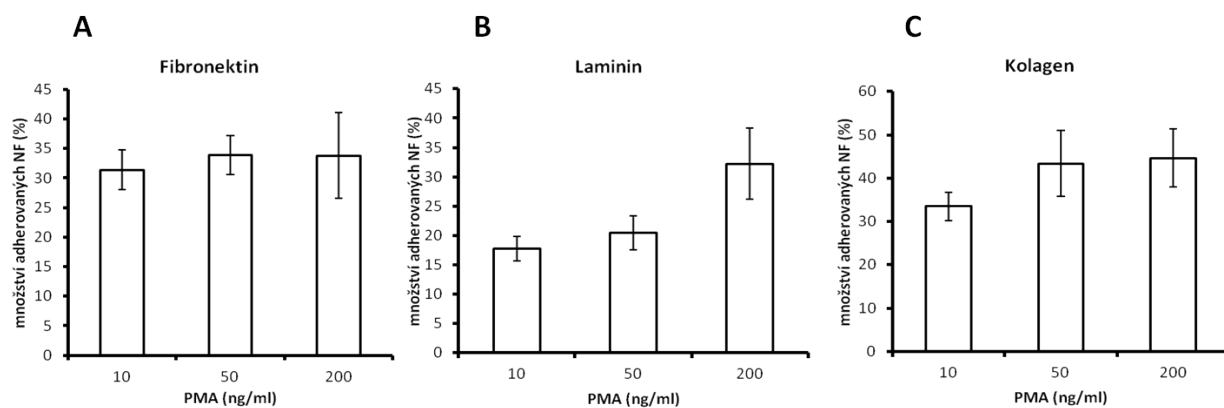
**Obrázek 9: Optimalizace promývání.** Neutrofilly adherovaly k proteinům ECM (fibronektinu, lamininu a kolagenu) o koncentraci 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Inkubace trvala 1 hod. Po každém měření byla 96 jamková destička promyta pomocí PBS. Statistická signifikance je vypočtena pomocí Studentova *t* testu. Množství adherovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 200 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

Dále jsem optimalizovala koncentrace proteinů extracelulární matrix (ECM) použitých na coating 96 jamkové destičky (viz bod 3.2.6 metodika). Zatímco na fibronectin a laminin buňky nejvíce adherovaly při nejnižší koncentraci, nejmenší variability bylo dosaženo při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 10A, B). U kolagenu (Obr. 10C) bylo nejvyšší adheze dosaženo při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Pro optimalizaci dalších faktorů ve všech následujících experimentech byla použita koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ .



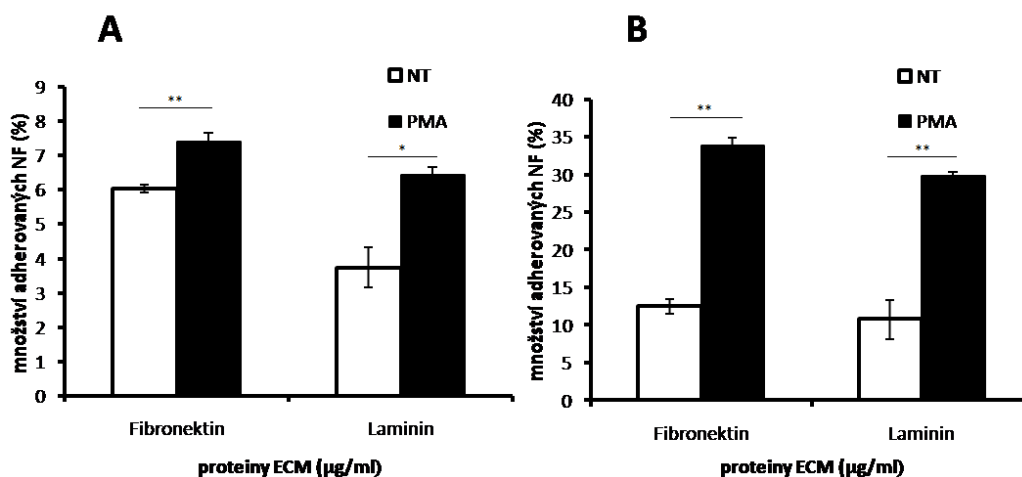
**Obrázek 10: Adheze neutrofilů při různých koncentracích proteinů ECM.** Neutrofilly byly aktivovány 50 ng/ml PMA, inkubovány 1 hod. a 3 x promyty PBS. Testované adhezivní proteiny byly fibronectin (A), laminin (B) a kolagen (C). Množství adherovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ .

Dále jsem hledala optimální koncentraci PMA, které slouží k aktivaci leukocytů, aby adherovaly k proteinům ECM (viz bod 3.2.6 metodika). V případě fibronectinu (Obr. 11A) bylo největší aktivace dosaženo při koncentraci 50 ng/ml. Pro laminin a kolagen (Obr. 11B, C) se ukázala být neoptimálnější koncentrace PMA 200 ng/ml. Během dalších optimalizačních experimentů byla použita koncentrace PMA 200 ng/ml.



**Obrázek 11: Adheze neutrofilů při různých koncentracích PMA.** Neutrofilly adheřovaly k proteinům ECM fibronektinu (A), lamininu (B) a kolagenu (C) o koncentraci 10 $\mu$ g/ml. Byly inkubovány 1 hod. a 3 x promyty pomocí PBS. Množství adheřovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM, n=4.

Během série experimentů testujících statickou adhezi *in vitro*, přestala být aktivace prostřednictvím PMA efektivní a nedařilo se dosáhnout dostatečného rozdílu mezi negativní (NT) a pozitivní (PMA) kontrolou, a tak byla zakoupena nová šarže PMA. Také byl zaveden nový protokol (viz bod 3.2.6. metodika tabulka 3, protokol B), který se v několika bodech lišil od původního. Nový protokol vedl k silnější adhezi neutrofilů a k výraznějším rozdílům mezi aktivovanými a neaktivovanými neutrofilly (Obr. 12A, B).

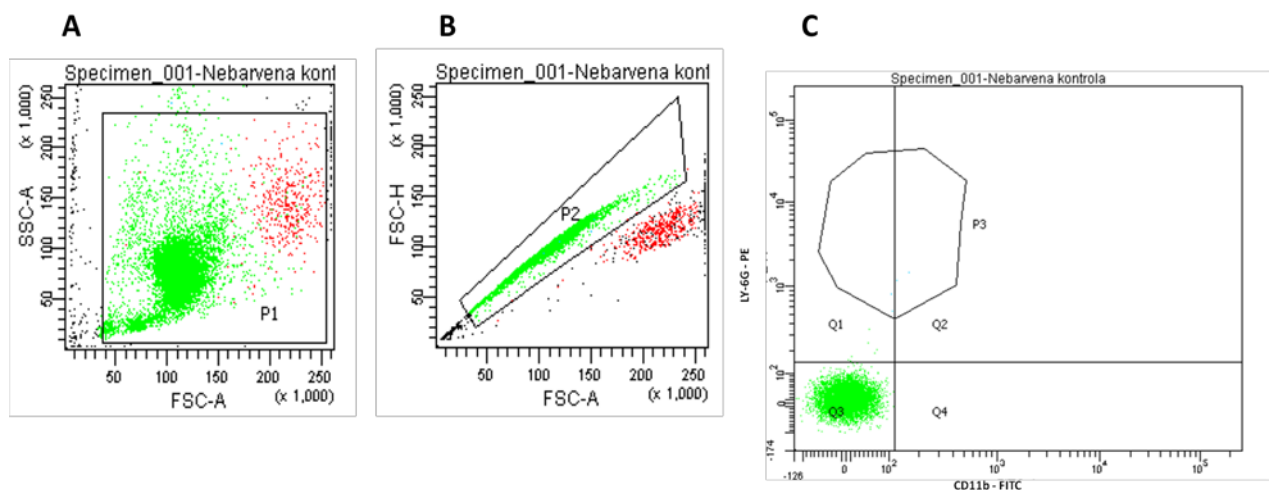


**Obrázek 12: Srovnání protokolů A a B.** Neutrofilly adheřovaly k proteinům ECM (fibronektinu a lamininu) o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Byly inkubovány 1 hod. a 3x promyty PBS. Postup podle dvou protokolů: protokolu A (A) a protokolu B (B). Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheřovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM, n=4, NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí PMA (A) 200ng/ml, (B) 50ng/ml (phorbol 12-myristate 13-acetate).

## 4.2 Měření čistoty buněk pomocí průtokové cytometrie

Před měřením čistoty neutrofilů pomocí průtokové cytometrie, jsem připravila 2 vzorky o objemu 100 $\mu$ l. První vzorek nebyl obarven pomocí fluorescenčně značených protilátek a sloužil jako negativní kontrola pro měření fluorescenčně značeného vzorku buněk (viz 3.2.5 bod metodika).

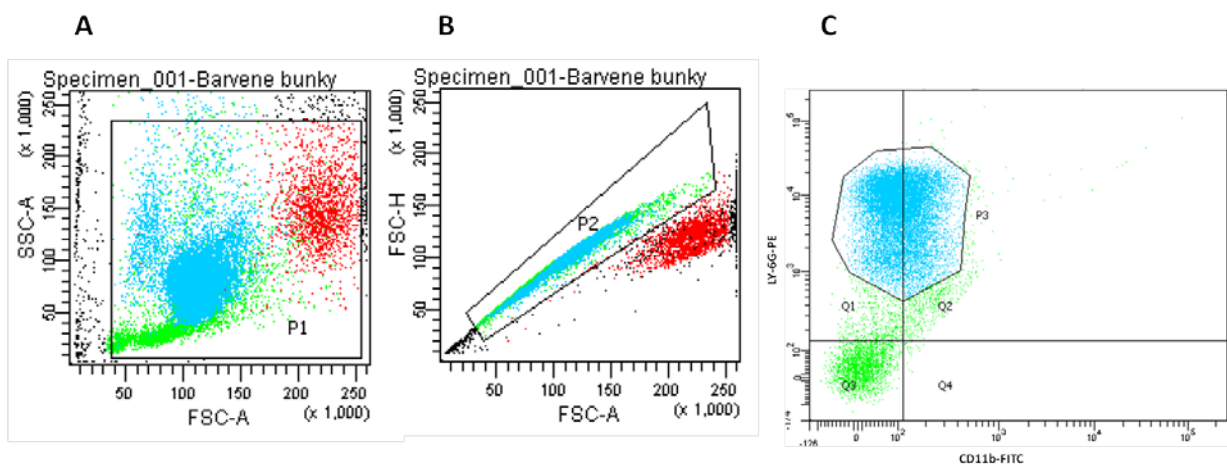
Pro vyhodnocení výsledků měření čistoty NF jsem vytvořila 3 následné analýzy. První analýza (Obr. 13A) sloužila k vyhodnocení granularity a velikosti buněk. Vše co se vyskytuje mimo černý rámeček, je vyloučeno z další analýzy. Dále byly odděleny singlety (samostatné buňky) od dubletů (Obr. 13B) a třetí analýza (Obr. 13C) sloužila k samotnému vyhodnocení čistoty zkoumané populace. Na obrázku 9C můžeme pozorovat v Q3 negativní kontrolu. Ohraničení populace nepravidelného tvaru na rozmezí Q1 a Q2 vzešlo až z analýzy fluorescenčně značeného vzorku.



**Obrázek 13: Měření negativní kontroly.** Vzorek buněk není fluorescenčně značený. Jedná se pouze o neutrofilovou populaci buněk 2x promytou a rozsuspendovanou v 100  $\mu$ l FACS pufru.

Následovalo měření vzorku buněk obsahujícího fluorescenčně značené protilátky CD11b (FITC) a Ly-6G (PE), což jsou diferenační povrchové molekuly (tzv. markery), které dokáží rozlišit různé leukocytární populace. Ly-6G je přítomný na neutrofilech a CD11b se využívá pro značení myeloidních buněk. Obrázek 14A znázorňuje zkoumanou neutrofilovou populaci P3 označenou světle modrou barvou. Zvýrazněné singlety byly pozorovány na Obrázku 14B a čistota sledované neutrofilové populace je znázorněna označením P3 na obrázku 14C.





**Obrázek 14: Měření čistoty neutrofilové populace.** Neutrofilů byly 30 minut barveny fluorescenčně značenými protilátkami CD11b a Ly-6G v lednici. Následovalo 2x promytí v 1 ml FACS pufru pomocí centrifugace 5 minut při 250 g. Pelet buněk po promytí byl rozsuspendován v 100  $\mu$ l FACS pufru.

Tabulka 5 znázorňuje procento zastoupení neutrofilů v množině singletů (P2), které je rovno 81,2 %.

**Tabulka 5: Zastoupení neutrofilové populace ve fluorescenčně značeném vzorku.**

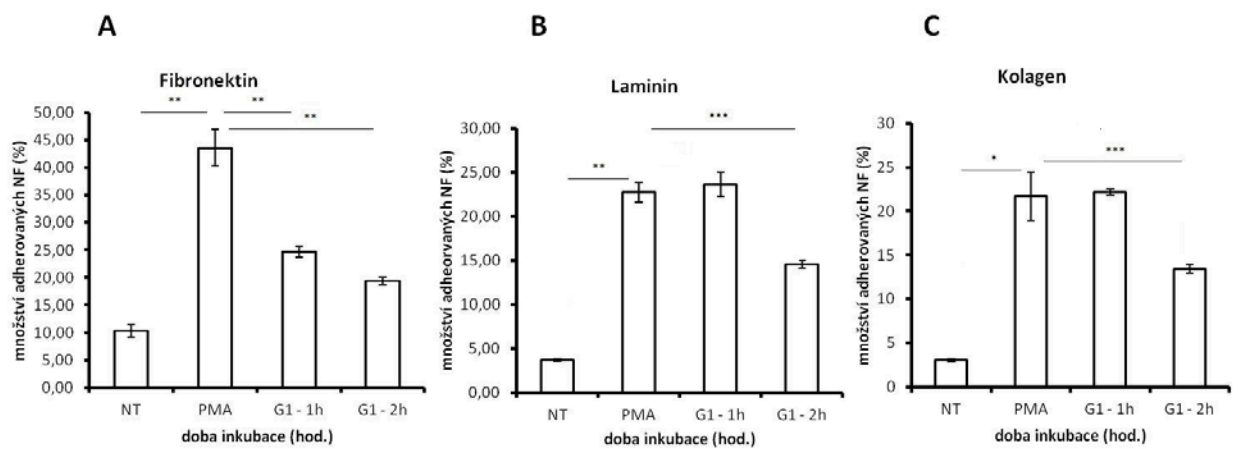
| Population   | #Events | %Parent | %Total |
|--------------|---------|---------|--------|
| ■ All Events | 22,104  | ####    | 100.0  |
| ■ P1         | 20,000  | 90.5    | 90.5   |
| ■ P2         | 18,642  | 84.3    | 84.3   |
| ☒ Q1         | 9,136   | 49.0    | 41.3   |
| ☒ Q2         | 6,998   | 37.5    | 31.7   |
| ☒ Q3         | 2,479   | 13.3    | 11.2   |
| ☒ Q4         | 29      | 0.2     | 0.1    |
| ■ P3         | 15,137  | 81.2    | 68.5   |

### 4.3 Testování inhibitorů

Cílem těchto experimentů bylo otestovat několik inhibitorů proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus* na jejich aktivitu inhibující adhezi leukocytů, popřípadě optimalizovat postup jejich testování. Testovány byly 3 inhibitory cysteinových (cystatiny) a 1 inhibitor serinových (serpin) proteáz (viz tabulka 4).

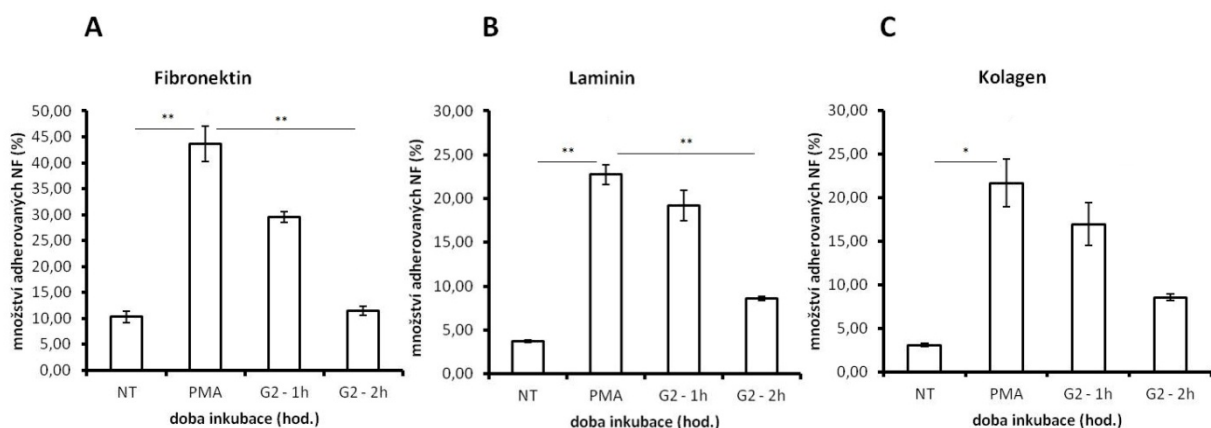
Nejdříve byla optimalizována doba pre-inkubace jednotlivých inhibitorů s buňkami. U všech testovaných cystatinů i proteinů ECM měla délka inkubační doby negativní vliv na intenzitu adheze. Cystatin G1 (Obr. 15 A, B, C) snížil u fibronektinu (Obr. 15 A) množství adherentních

neutrofilů již po 1 hodině pre-inkubace, u lamininu (Obr. 15B) a kolagenu (Obr.15C) byla snižená adheze pozorována až po dvouhodinové pre-inkubaci.



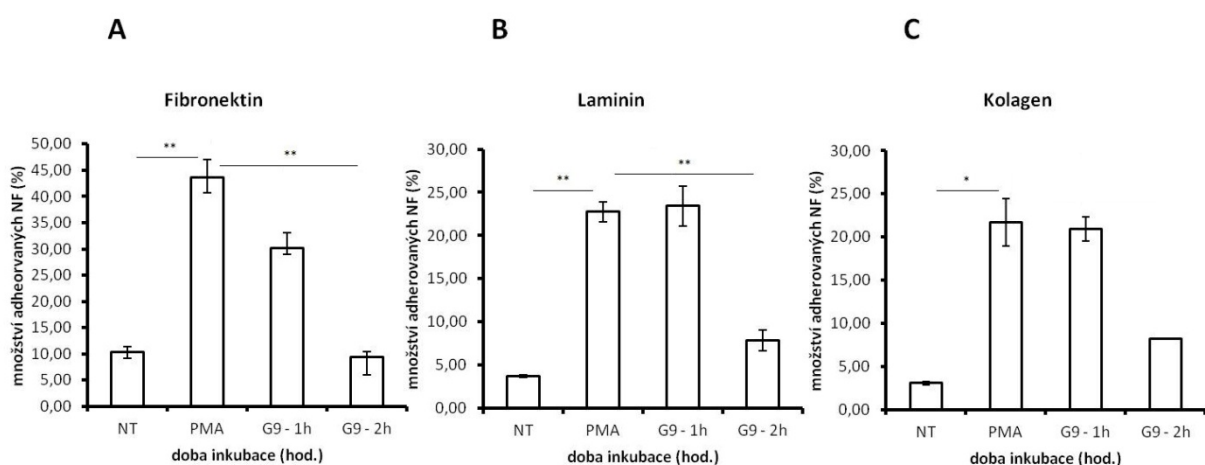
**Obrázek 15: Aktivita inhibitoru G1 při různých dobách inkubace.** Bylo měřeno množství adheovaných neutrofilů k proteinům ECM (A) fibronektinu, (B) lamininu a (C) kolagenu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  po 3x promytí PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 200 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

U cystatinu G2 byla aktivita inhibující adhezi neutrofilů u všech tří testovaných proteinů ECM srovnatelná (Obr. 16 A, B, C). Dvouhodinová doba inkubace s inhibitory snižuje procento adheovaných neutrofilů výrazněji, než je tomu u hodinové inkubační doby a toto se potvrzuje u všech proteinů ECM.



**Obrázek 16: Aktivita inhibitoru G2 při různých dobách inkubace.** Bylo měřeno množství adheovaných neutrofilů k proteinům ECM (A) fibronektinu, (B) lamininu a (C) kolagenu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  po 3x promytí PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 200 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

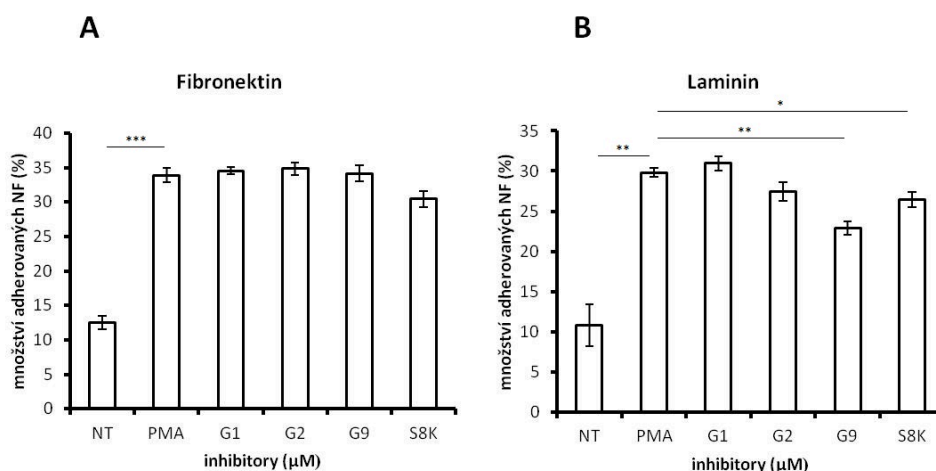
Třetím testovaným inhibitorem byl cystatin G9. Zatímco u fibronektinu (Obr. 17A) je procento buněk po hodinové inkubaci s G9 sníženo, u lamininu (Obr. 17 B) a kolagenu (Obr. 17 C) je množství buněk inkubované 1 hodinu s G9 srovnatelné s množstvím buněk obsahujícím pouze PMA. Aktivita inhibice adheze po 2 hodinách inkubace je patrná u všech proteinů ECM.



**Obrázek 17: Aktivita inhibitoru G9 při různých dobách inkubace.** Bylo měřeno množství adheovaných neutrofilů k proteinům ECM (A) fibronektinu, (B) lamininu a (C) kolagenu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  po 3. promytí 100  $\mu\text{l}$  PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 200 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

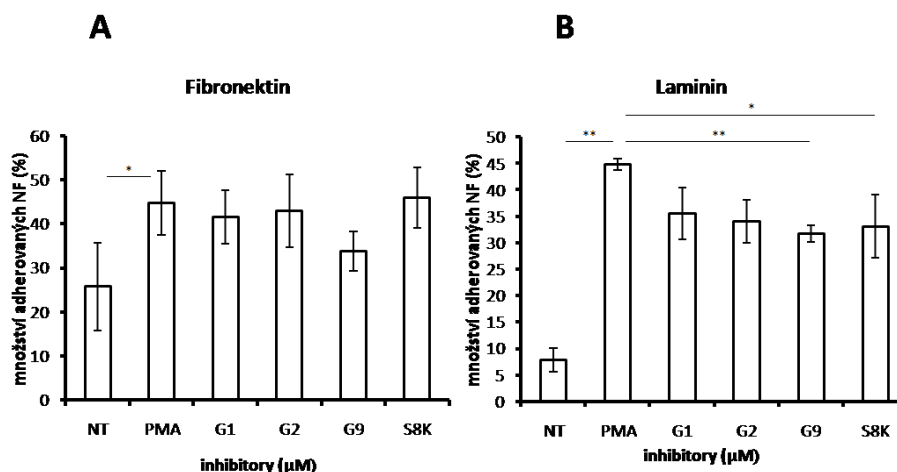
Následovalo ověření výsledků optimalizace inkubační doby při různých koncentracích inhibitorů. Jako první byl experiment proveden s koncentrací inhibitorů 1  $\mu\text{M}$ . Zatímco u fibronektinu (Obr. 18A) není inhibice adheze téměř znatelná, u lamininu (Obr. 18B) jsou u

cystatinů G2 a G9 a serpinu S8K znatelné slabé inhibiční účinky. Nejnižší procento adherovaných neutrofilů bylo zaznamenáno u inhibitoru G9.



**Obrázek 18: Koncentrace inhibitorů 1 $\mu\text{M}$ .** Neutrofilly adherovaly k proteinům ECM (A) fibronektinu a (B) lamininu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Byly inkubovány 2 hod. a 3x promyty PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adherovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

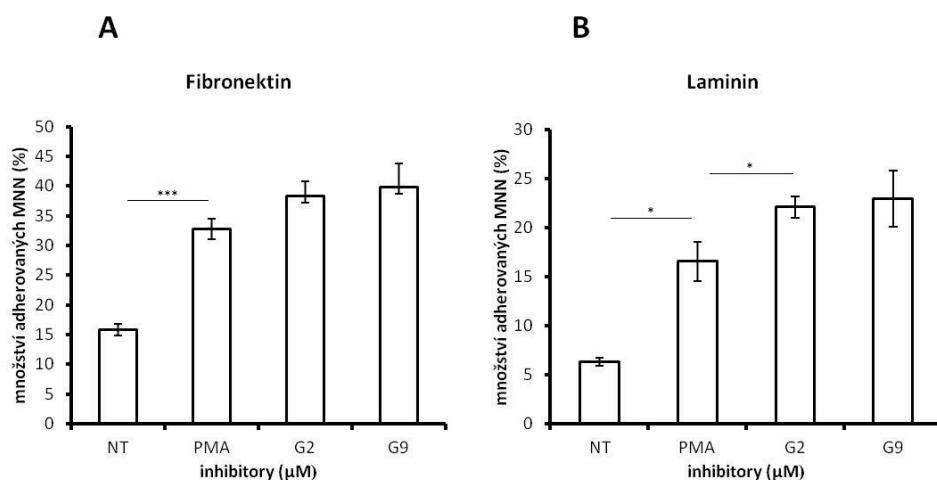
Další testovaná koncentrace inhibitorů byla 3  $\mu\text{M}$ . U fibronektinu (Obr.19A) bylo nejnižší množství adherovaných neutrofilů zaznamenáno u cystatinu G9. Hodnoty ostatních inhibitorů jsou srovnatelné s množstvím buněk v pozitivní kontrole. V případě lamininu (Obr. 19B) bylo množství adherovaných neutrofilů sníženo u všech 4 inhibitorů téměř stejně.



**Obrázek 19: Koncentrace inhibitorů 3 $\mu\text{M}$ .** Neutrofilý adherovaly k proteinům ECM (A) fibronektinu a (B) lamininu o koncentraci 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Byly inkubovány 2 hod. a 3x promyty PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheřovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM,  $n=4$ , NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

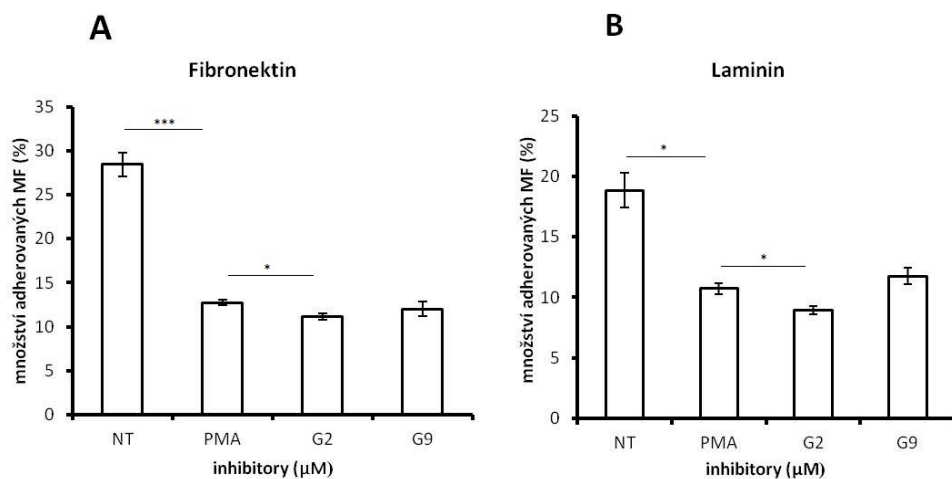
Testování adheze bylo provedeno s různými typy leukocytárních buněk. Kromě neutrofilů se jednalo o peritoneální makrofágy a mononukleární buňky, které představují heterogenní populaci složenou z monocytů, NK buněk, T lymfocytů a B lymfocytů. Testování adheze bylo zaměřené především na monocyty.

U mononukleárních buněk, (Obr. 20) byl jak u fibronektinu (Obr. 20A), tak u lamininu (Obr. 20B), zaznamenán rozdíl mezi negativní a pozitivní kontrolou. Pre-inkubace s cystatiny vedla k zesílení adheze neutrofilů. Jedná se pravděpodobně o specifický účinek inhibitorů cysteinových proteáz.



**Obrázek 20: Mononukleární buňky inkubované s inhibitory G2 a G9.** Mononukleární buňky byly inkubovány 2 hod. a 3x promyty PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheřovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM, n=4, NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

Aktivace PMA vedla u peritoneálních makrofágů ke snížení adheze v porovnání s negativní kontrolou. Přesto je statisticky průkazný rozdíl mezi PMA a G2. Z tohoto důvodu jsem další pokusy s těmito buňkami neprováděla.



**Obrázek 21: Peritoneální makrofágy inkubované s inhibitory G2 a G9.** Peritoneální makrofágy byly inkubovány 2 hod. a 3x promyty PBS. Statistická signifikance je vyjádřena pomocí Studentova *t* testu. Množství adheřovaných buněk je vyjádřeno jako procento z původního množství, výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM, n=4, NT = negativní kontrola (no treatment), PMA = aktivace pomocí 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

## 5. Diskuze

Hlavními cíly této práce bylo optimalizovat experimentální parametry statické adheze *in vitro* a následně otestovat několik inhibitorů klíčících proteáz (cystatinů a serpinů) na jejich inhibiční účinek na adhezi leukocytů, která je důležitou součástí rekrutace leukocytů při zánětu (Granger et al., 2010).

Prostřednictvím série optimalizačních experimentů se podařilo najít optimální podmínky pro experimentální ověření adheze *in vitro* a zároveň pro následné testování inhibitorů klíčících proteáz. První krok optimalizace zahrnoval stanovení nejvhodnějšího promytí (viz Obr. 9). Přestože u všech experimentů bylo měřeno 5x promytí, jako směrodatné pro vyhodnocování bylo shledáno 3xpromytí a to z toho důvodu, že zahrnuje nejideálnější poměr mezi negativní kontrolou a aktivovanými neutrofilů PMA. To se potvrzuje také při srovnání s protokolem poskytnutým Dr. Kyoung-Jin Chungem, který testoval adhezi na THP-1 monocytech. Dále jsem se zaměřila na výběr nejvhodnější koncentrace proteinů ECM (fibronektinu, lamininu a kolagenu), které představují ligandy pro  $\beta_1$  integriny při leukocytární adhezi (Hořejší et al., 2013). Jako optimální byla zvolena koncentrace proteinů ECM rovna 10  $\mu\text{g/ml}$ . Tato použitá koncentrace proteinů ECM je shodná v protokolu Cell Adhesion Assay (Kucik et al., 2005). U fibronektinu a lamininu bylo sice procento adheze nejvyšší při koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ , ale směrodatná odchylka vykazovala nejnížší variabilitu právě u koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$  a v případě kolagenu se jevila tato koncentrace jako neoptimálnější z obou pohledů. V porovnání s koncentrací 30  $\mu\text{g/ml}$ , je její výhodou také nižší spotřeba proteinů při coatingu. Následovalo vyhodnocení nejvhodnější koncentrace PMA, které bylo zásadní pro maximálně efektivní aktivaci neutrofilů. Zpočátku se jevila koncentrace 200  $\text{ng/ml}$  jako optimální. U lamininu a kolagenu vyvolala nejefektivnější aktivaci neutrofilů. U fibronektinu byla hodnota adherovaných neutrofilů srovnatelná u koncentrací 50  $\text{ng/ml}$  a 200  $\text{ng/ml}$ . V průběhu experimentů začala selhávat aktivace neutrofilů, a tak bylo zakoupeno nové PMA a byl testován postup podle nového protokolu (viz bod 3.2.6 metodika, tabulka 3, protokol B). Kromě několika dalších změn byla koncentrace PMA upravena na 50  $\text{ng/ml}$ . Protokol B se ukázal být efektivnější při srovnávání hodnot negativní kontroly a aktivace PMA (Obr. 12B).

V rámci experimentů byla také měřena čistota neutrofilů, se kterými byl pokus adheze proveden, protože se nejednalo o buněčnou linii, ale o frakci primárních buněk vyizolovaných z kostní dřeně myši. Prostřednictvím měření čistoty průtokovou cytometrií byla hodnota čistoty

vyizolovaných neutrofilů stanovena na 81.2 % (ze singletů), což bylo shledáno jako dostatečné pro použití při experimentech.

Při optimalizaci testování klíštěcích inhibitorů proteáz bylo testováno několik faktorů. Jako první byl sledován vliv dvou různých inkubačních časů s cystatiny G1 (viz Obr. 15), G2 (viz Obr. 16) a G9 (viz Obr. 17). U všech tří výše zmiňovaných inhibitorů cysteinových proteáz se ukázala být delší inkubační doba optimálnější. Tento výsledek byl následně aplikován v rámci testování adheze *in vitro*, provedeném podle protokolu B, na 1  $\mu$ M (viz Obr. 18) a 3  $\mu$ M (viz Obr. 19) koncentracích inhibitorů. Výraznější inhibiční efekt byl pozorován při 3 $\mu$ M koncentraci u cystatinu G9. Testování adheze zahrnující testování inhibitorů klíštěcích proteáz bylo provedeno s různými leukocytárními buňkami, konkrétně s mononukleárními buňkami a peritoneálními makrofágy. Mononukleární buňky představují heterogenní populaci, zahrnující monocyty, NK buňky, T a B lymfocyty. V rámci experimentu s mononukleárními buňkami (viz Obr. 20) šlo hlavně o testování adheze monocytů k proteinům ECM, protože lymfocyty nejsou adherentními buňkami. Inhibiční efekt cystatinů se ukázal být specifický pro neutrofilů. Ačkoliv byla hodnota negativní kontroly nízká a aktivace efektivní, u testovaných cystatinů nebyly prokázány žádné inhibiční účinky na mononukleární buňky. V případě peritoneálních makrofágů (viz Obr. 21) bylo procento adherovaných buněk nejvyšší u negativní kontroly, což může svědčit o aktivaci makrofágů již v peritoneu myši. Vzhledem k hodnotám pozitivní a negativní kontroly makrofágů je otázkou, zda je pozorovaný vliv cystatinu G2 z obrázku 21 věrohodný. Podobný výsledek u fibronektinu a lamininu by však mohl vypovídat o skutečném efektu.

Vliv klíštěcích cystatinů na imunitu hostitele byl předmětem zájmu několika studií, málo z nich se však věnuje objasnění mechanismu inhibice leukocytární adheze prostřednictvím klíštěcích inhibitorů proteáz. Tento mechanismus nebyl dosud objasněn. V místě přísátí klíštěte dochází k velmi rychlé aktivaci buněk přirozené imunity, jako jsou například neutrofilů, makrofágy, dendritické buňky, NK buňky a vzniká zde zánět (Heath et al., 2013). Klíště se této odezvě ze strany hostitele brání a vyvinulo si řadu mechanismů, jak snížit riziko, které pro něj imunitní reakce hostitele představuje (Francischetti et al., 2009). Součástí těchto mechanismů by pravděpodobně mohla být inhibice leukocytární adheze prostřednictvím klíštěcích inhibitorů proteáz, což by vedlo k zablokování transmigrace leukocytů do místa zánětu a tím i k zmírnění zánětlivé odpovědi.



## 6. Závěr

V této práci byl optimalizován postup experimentálního ověření adheze leukocytů k proteinům ECM a také byl sestaven protokol pro testování inhibitorů klíčících proteáz na případné protiadhezivní účinky.

Byly otestovány inhibitory cysteinových a serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus*, cystatiny G1, G2, G9 a serpin S8K. U cystatinu G9 byla zaznamenána prokazatelná aktivita inhibující adhezi neutrofilů při všech experimentech. Ostatní inhibitory vykazovaly slabší inhibiční efekt za specifických podmínek. Tím bylo potvrzeno, že inhibitory cysteinových proteáz fungují jako inhibitory adheze.

## Použitá literatura

- ABBAS, Abul K, Andrew H LICHTMAN a Shiv PILLAI. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, c2012. ISBN 9780808924258.
- ABRAHAMSON, Magnus; ALVAREZ-FERNANDEZ, Marcia; NATHANSON, Carl-Michael. Cystatins. In: *Biochemical Society Symposia*. Portland Press Limited, 2003. p. 179-199.
- ARNAOUT, M. A.; MAHALINGAM, B.; XIONG, J.-P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, 21: 381-410.
- BAGGIOLINI, Marco; DEWALD, Beatrice; MOSER, Bernhard. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology*, 1997, 15.1: 675-705.
- BAGGIOLINI, M.; MOSER, B.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. *CHEST-CHICAGO-*, 1994, 105: 95S-95S.
- BERNFELD, M., et al. Remodeling of the basement membrane as a mechanism of morphogenetic tissue interaction. *The role of extracellular matrix in development*, 1984, 545-572.
- BEVILACQUA, Michael P., et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84.24: 9238-9242.
- BEVILACQUA, Michael P., et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 1989, 243.4895: 1160-1165.
- BOGEN, Steven, et al. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 1994, 179.3: 1059-1064.
- BÖKEL, Christian; BROWN, Nicholas H. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Developmental cell*, 2002, 3.3: 311-321.
- COTENA, Alessia, et al. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. *The Journal of Immunology*, 2007, 179.9: 6311-6317.

- CUCULLO, Luca, et al. A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2011, 31.2: 767-777.
- DEBAN, Livija, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nature immunology*, 2010, 11.4: 328-334.
- DIAZ-GONZALEZ, F., et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95.4: 1756.
- DIEU, Marie-Caroline, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine*, 1998, 188.2: 373-386.
- DUSTIN, Michael L.; SPRINGER, Timothy A. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 1988, 107.1: 321-331.
- ED. BY DHANJOO N. GHISTA. *Biomedical science, engineering and technology*. 1. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 9789533074719
- ELICES, Mariano J., et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 1990, 60.4: 577-584.
- ELLIOTT, Peter R., et al. Inhibitory conformation of the reactive loop of  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1996, 3.8: 676-681.
- ERIKSSON, Einar E., et al. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 2001, 194.2: 205-218.
- FERNANDEZ, Elias J.; LOLIS, Elias. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2002, 42.1: 469-499.
- FRANCISCHETTI, Ivo MB, et al. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 2009, 14: 2051.

- GRANGER, D. Neil; SENCHENKOVA, Elena. Inflammation and the Microcirculation. In: *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. p. 1-87.
- HAKKERT, B. C., et al. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood*, 1991, 78.10: 2721-2726.
- HEATH, William R.; CARBONE, Francis R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature immunology*, 2013, 14.10: 978-985.
- HONEY, Karen; RUDENSKY, Alexander Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3.6: 472-482.
- HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2013. ISBN 9788073877132.
- HYNES, Richard O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, 69.1: 11-25.
- CHOI, Eun Young, et al. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science*, 2008, 322.5904: 1101-1104.
- ISLAM, Sabina A.; LUSTER, Andrew D. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nature medicine*, 2012, 18.5: 705-715.
- JULIANO, Rudolph L.; HASKILL, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology*, 1993, 120: 577-577.
- KELLY, Margaret; HWANG, John M.; KUBES, Paul. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 120.1: 3-10.
- KEMPF, Tibor, et al. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research*, 2006, 98.3: 351-360.
- KEMPF, Tibor, et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nature medicine*, 2011, 17.5: 581-588.

- KIM, Minsoo; CARMAN, Christopher V.; SPRINGER, Timothy A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, 2003, 301.5640: 1720-1725.
- KUCIK, Dennis F.; WU, Chuanyue. Cell-adhesion assays. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 2005, 43-54.
- KUMAR, Ajith G., et al. Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. *The Journal of Immunology*, 1994, 153.9: 4088-4098.
- KUNKEL, Eric J., et al. The roles of L-selectin,  $\beta$ 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *The Journal of Immunology*, 1998, 161.5: 2449-2456.
- KUNKEL, Eric J.; LEY, Klaus. Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice E-Selectin Is Required for Slow Leukocyte Rolling In Vivo. *Circulation Research*, 1996, 79.6: 1196-1204.
- LAWRENCE, Michael B., et al. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L, P, E). *The Journal of cell biology*, 1997, 136.3: 717-727.
- LEONG, Hon Sing, et al. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. *Nature protocols*, 2010, 5.8: 1406-1417.
- LODOWSKI, David T.; PALCZEWSKI, Krzysztof. Chemokine receptors and other GPCRs. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2009, 4.2: 88.
- LOETSCHER, Pius; MOSER, Bernhard; BAGGIOLINI, Marco. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Advances in immunology*, 2000, 74: 127-180.
- LEY, Klaus, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7.9: 678-689.
- MA, Chaoyu; WANG, Xiao-Fan. In vitro assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008, 2008.8: pdb. prot5034.
- MASEDUNSKAS, Andrius, et al. Intravital microscopy: A practical guide on imaging intracellular structures in live animals. *Bioarchitecture*, 2012, 2.5: 143-157.
- MCEVER, Rodger P., et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *Journal of Clinical Investigation*, 1989, 84.1: 92.

- MCEVER, Rodger P.; CUMMINGS, Richard D. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100.3: 485.
- MITSUOKA, Chikako, et al. Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273.18: 11225-11233.
- MOSER, B.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases*, 2004, 63.suppl 2: ii84-ii89.
- MULLER, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary Pathology Online*, 2013, 50.1: 7-22.
- MULLER, William A. PECAM: Regulating the start of diapedesis. In: *Adhesion molecules: Function and inhibition*. Birkhäuser Basel, 2007. p. 201-220.
- NAGASAWA, Takashi, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996, 382.6592: 635-638.
- NEOTE, Kuldeep, et al. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a CC chemokine receptor. *Cell*, 1993, 72.3: 415-425.
- OPPERMANN, Martin. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular signalling*, 2004, 16.11: 1201-1210.
- PETRIE, Ryan J.; DOYLE, Andrew D.; YAMADA, Kenneth M. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10.8: 538-549.
- PHILLIPSON, Mia, et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine*, 2006, 203.12: 2569-2575.
- REDDY, Vivek Y.; ZHANG, Qing-Yu; WEISS, Stephen J. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92.9: 3849-3853.
- RESNICK, Nitzan, et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Progress in biophysics and molecular biology*, 2003, 81.3: 177-199.

- ROLLINS, Barrett J. Chemokines. *Blood*, 1997, 90.3: 909-928.
- ROSEN, S. D. Ligands for L-selectin: where and how many?. *Research in immunology*, 1993, 144.9: 699-703.
- SCHENKEL, Alan R.; MAMDOUH, Zahra; MULLER, William A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature immunology*, 2004, 5.4: 393-400.
- SPRINGER, Timothy A.; WANG, Jia-Huai. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Advances in protein chemistry*, 2004, 68: 29-63.
- TADOKORO, Seiji, et al. Talin binding to integrin  $\beta$  tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 2003, 302.5642: 103-106.
- TESSIER, Philippe A., et al. Chemokine networks in vivo: involvement of CXC and CC chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *The Journal of Immunology*, 1997, 159.7: 3595-3602.
- THELEN, Marcus. Dancing to the tune of chemokines. *Nature immunology*, 2001, 2.2: 129-134.
- TURK, Vito; BODE, Wolfram. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS letters*, 1991, 285.2: 213-219.
- VAN DE STOLPE, A.; VAN DER SAAG, P. T. Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Molecular Medicine*, 1996, 74.1: 13-33.
- VAN SEVENTER, GIJS A., et al. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *The Journal of Immunology*, 1990, 144.12: 4579-4586.
- VAPORCIYAN, Ara A., et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, 1993, 262.5139: 1580-1582.
- WILLE, Aline, et al. Cathepsin L is involved in cathepsin D processing and regulation of apoptosis in A549 human lung epithelial cells. *Biological chemistry*, 2004, 385.7: 665-670.
- WOODFIN, Abigail, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology*, 2011, 12.8: 761-769.

WYCKOFF, Jeffrey B., et al. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer research*, 2000, 60.9: 2504-2511.

XIA, Lijun, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *The Journal of clinical investigation*, 2002, 109.7: 939-950.

YANG, Jing, et al. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *The Journal of experimental medicine*, 1999, 190.12: 1769-1782.



## Seznam obrázků a tabulek

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1: Popis transmigrace leukocytů .....  | 3  |
| Obrázek 2: Selektiny a jejich ligandy .....  | 7  |
| Obrázek 3: Integriny a jejich ligandy .....  | 9  |
| Obrázek 4: Přehled selektinů a integrinů .....   | 9  |
| Obrázek 5: Přehled chemokinů a chemokinových receptorů .....                             | 12 |
| Obrázek 6: Zobrazení leukocytární adheze a transmigrace v intravitálním mikroskopu ..... | 16 |
| Obrázek 7: Schéma izolace mononukleárních buněk na denzitním gradientu .....             | 19 |
| Obrázek 8: Schéma izolace neutrofilů na denzitním gradientu .....                        | 20 |
| Obrázek 9: Optimalizace promývání .....  | 24 |
| Obrázek 10: Adheze neutrofilů při různých koncentracích proteinů ECM .....               | 25 |
| Obrázek 11: Adheze neutrofilů při různých koncentracích PMA .....                        | 26 |
| Obrázek 12: Srovnání protokolů A a B .....   | 26 |
| Obrázek 13: Měření negativní kontroly .....  | 27 |
| Obrázek 14: Měření čistoty neutrofilové populace .....                                   | 28 |
| Obrázek 15: Aktivita inhibitoru G1 při různých dobách inkubace .....                     | 29 |
| Obrázek 16: Aktivita inhibitoru G2 při různých dobách inkubace .....                     | 30 |
| Obrázek 17: Aktivita inhibitoru G9 při různých dobách inkubace .....                     | 30 |
| Obrázek 18: Koncentrace inhibitorů 1 $\mu$ M .....                                       | 31 |
| Obrázek 19: Koncentrace inhibitorů 3 $\mu$ M .....                                       | 32 |
| Obrázek 20: Mononukleární buňky inkubované s inhibitory G2 a G9 .....                    | 33 |
| Obrázek 21: Peritoneální makrofágy inkubované s inhibitory G2 a G9 .....                 | 33 |
| <br>   |    |
| Tabulka 1: Přehled použitých materiálů .....   | 18 |
| Tabulka 2: Ředění Percollu .....   | 20 |
| Tabulka 3: Porovnání protokolu A a B .....   | 22 |
| Tabulka 4: Přehled testových inhibitorů klišťecích proteáz .....                         | 23 |
| Tabulka 5: Zastoupení neutrofilové populace ve fluorescenčně značeném vzorku. ....       | 28 |