

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Imunologie



Bc. Karolina Knížková

Studium maternálně-fetálního mikrochimérismu APC s využitím MHCII/EGFP myšního modelu a clearovacích histologických technik

Study of the materno-fetal microchimerism of the APC using MHCII/EGFP mouse model and clearing histological techniques

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Praha, 2020

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.6.2020

.....

Karolina Knížková

## Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Janu Černému, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce za vstřícnost, podporu a udělování spousty cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Valerii Grobárové, Ph.D. a Mgr. Janu Pačesovi za obětavou pomoc a nesmírnou trpělivost při zaučování metodiky.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem co se podíleli na realizaci experimentů a analýze dat a to konkrétně: Bc. Lence Backové za skvělé nápady a velkou pomoc při analýze obrazových dat, Mgr. Ondřeji Šebestovi za pomoc v oblasti mikroskopie, Mgr. Heleně Chmelové za spolupráci při zavádění metody light sheet mikroskopie a MVDr. Jozefu Jandovi, Ph.D. za jeho rady při vyhodnocování cytometrických dat.

## Abstrakt

Mikrochimérismus vzniká výměnou buněk mezi geneticky odlišnými jedinci. Koexistence geneticky odlišných populací buněk v rámci jednoho organismu přináší možné dopady na zdraví a fungování imunitního systému jedinců, ale přesné mechanismy působení nejsou ještě často známy. S rozvojem mikroskopických technologií a softwarů pro analýzu dat se rozšiřují možnosti detekce a fenotypizace těchto vzácných buněčných populací. Mým záměrem v této práci je vyhledání maternálního mikrochimérismu v tkáních embrya a střevech kojených mláďat s využitím MHCII/EGFP *knock-in* myšího modelu, který jsme k tomuto účelu vytvořili.

Bylo vybráno několik různých technologií potenciálně vhodných pro detekci maternálních mikrochimérních buněk v tkáních potomka (fluorescenční light sheet mikroskopie – LSFM, virtual slide mikroskopie a průtoková cytometrie). Byla zde využita pokročilá analýza získaných vzorků z light sheet mikroskopie pomocí tvorby neuronové sítě.

Metodou průtokové cytometrie přítomnost maternálního mikrochimérismu nebyla prokázána. Pomocí LSFM byla získána obrazová data ze vzorků střev kojených mláďat, která byla zpracována metodou neuronové sítě. U obrazových dat embryí (E13) získaných stejnou metodou nebyla možná analýza dat vlivem vysoké autofluorescence. Pro porovnání byla použita metoda virtual slide mikroskopie, avšak úspěšné vyhodnocení těchto dat bude vyžadovat další zkoumání. Tato práce je prvním krokem k hlubšímu pochopení daného jevu. Zavedení nového modelu a metodiky uvedené v této práci včetně kvantitativní histologické analýzy nám může významně pomoci při dalším zkoumání této problematiky.

### Klíčová slova:

mikrochimérismus, clearovací histologické metody, antigen-prezentující buňky, light sheet mikroskopie

## Abstract

Microchimerism arises from the exchange of cells between genetically distinct individuals. The coexistence of genetically distinct cell populations within a single organism has possible effects on health and functioning of individuals immune systems, but the exact mechanisms of action are often not yet known. With the development of microscopic technologies and software for data analysis, the possibilities of detection and phenotyping of these rare cell populations are expanding. My intention in this work is to find maternal microchimerism in embryonic tissues (E13) and intestines of breastfed pups using MHCII/EGFP *knock-in* mouse model.

Several different technologies potentially suitable for the detection of maternal microchimeric cells in offspring tissues (light sheet fluorescent microscopy – LSFM, virtual slide microscopy and flow cytometry) were selected. Advanced analysis of the obtained samples from the light sheet microscopy using the creation of a neural network was used here.

The presence of maternal microchimerism was not demonstrated by flow cytometry. Using LSFM, image data were obtained from intestinal samples of suckling pups, which were processed by the neural network method. Data analysis of embryos (E13) obtained by the same method did not allow data analysis due to high autofluorescence. The method of virtual slide microscopy was used for comparison, but these data will need further investigation. This work is the first step to a deeper understanding of the phenomenon. The introduction of a new model and methodology presented in this work, including quantitative histological analysis, can significantly help us in further research on this issue.

## Key words:

microchimerism, clearing histological techniques, antigen-presenting cells, light sheet microscopy

## Seznam použitých zkratek

AGM	aorta-gonády-mezonefros (aorta-gonad-mesonephros)
APC	antigen prezentující buňky (antigen presenting cell)
BFM	bromfenolová modř
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
CIITA	transaktivátor třídy II (class II transactivator)
CLIP	peptid z invariantního řetězce asociovaný s MHC gp II (class II-associated invariant chain peptide)
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
cTEC	kortikální epiteliální buňky thymu (cortical epithelial cell)
DAMP	molekulární vzory asociované s nebezpečím (danger associated molecular pattern)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	dendritické buňky (dendritic cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dsRNA	dvouvláknová ribonukleová kyselina (double strand ribonucleic acid)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFP	zesílený zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein)
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
FMO	kontroly pro průtokovou cytometrii (fluorescence minus one)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)

gp	glykoprotein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen (human leukocyte antigen)
IEC	střevní epitelální buňky (intestine epithelial cells)
ILC	přirozené lymfoidní buňky (innate lymphoid cells)
IS	imunitní systém
LNSC	stromální buňky lymfatických uzlin (lymph node stromal cells)
LPS	lipopolysacharid
LSFM	fluorescenční light sheet mikroskop (light sheet fluorescent microscop)
MHCII	hlavní histokompatibilní komplex II.třídy (major histocompatibility complex II.class)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
mTEC	medulární epitelální buňky thymu (medullary epithelial cell)
NIMAs	nezděděné mateřské antigeny (noninherited maternal antigens)
N-TEA	N,N,N',N'-Tetrakis(2-Hydroxypropyl)ethylendiamin
PAMP	molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PRR	receptor rozpoznávající vzory (pattern recognition receptor)
TBE	Tris-borát-EDTA pufr (Tris-Borate-EDTA buffer)
TCR	T-buněčný receptor (T cell receptor)
TEA	triethanolamin

TFH	pomocné folikulární T lymfocyty (T follicular helper cells)
Tregs	regulační T lymfocyty (regulatory T cells)
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
wt	divoký typ myši (wild type)
YS	žloutkový váček (yolk sac)



# Obsah

1.	Úvod .....	1
2.	Literární přehled.....	2
2.1.	Antigen prezentující buňky .....	2
2.1.1.	Molekula MHC II. třídy .....	3
2.2.	Vývoj imunitního systému.....	6
2.3.	Mikrochimérismus .....	10
2.4.	Mléko jako imunomodulans .....	12
2.5.	Metody pro detekci mikrochimérismu .....	16
2.5.1.	Light sheet mikroskopie .....	16
2.5.2.	Virtual slide mikroskopie.....	19
2.5.3.	MHCII/EGFP <i>knock-in</i> myší model.....	19
3.	Cíle.....	22
4.	Materiály a metody.....	23
4.1.	Materiál.....	23
4.1.1.	Chemikálie a roztoky .....	23
4.1.1.1.	Protilátky .....	24
4.1.1.2.	Projasňování tkání.....	25
4.1.2.	Spotřební materiál .....	26
4.1.3.	Přístroje .....	26
4.1.3.1.	Mikroskopie.....	26
4.1.3.2.	Průtoková cytometrie .....	26
4.1.3.3.	Genotypizace.....	26
4.1.3.4.	Ostatní přístroje .....	27
4.1.4.	Modelové organismy.....	27
4.2.	Metody.....	27
4.2.1.	Vytvoření myšího modelu pro výzkum maternálního mikrochimérismu .....	27
4.2.2.	Genotypizace.....	29
4.2.2.1.	Izolace DNA .....	29
4.2.2.2.	PCR .....	29
4.2.2.3.	Agarózová elektroforéza .....	31
4.2.3.	Mikroskopie.....	32
4.2.3.1.	Příprava histologických řezů .....	32
4.2.3.2.	Značení řezů fluorescenčními protilátkami.....	32
4.2.3.3.	Clearing tkání pro light sheet mikroskopii .....	33

4.2.3.4.	Vytváření neuronové sítě při analýze dat z light sheet mikroskopie .....	33
4.2.4.	Průtoková cytometrie .....	35
4.2.4.1.	Příprava buněk pro průtokovou cytometrii .....	35
•	Slezina .....	35
•	Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky .....	35
•	Embrya .....	36
4.2.4.2.	Značení fluorescenčními protilátkami.....	36
5.	Výsledky .....	37
5.1.	Detekce embryonálního mikrochimérismu .....	37
5.1.1.	Detekce MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk v embryu pomocí průtokové cytometrie .....	37
5.1.2.	Detekce MHCII/EGFP <sup>+</sup> v embryu pomocí light sheet mikroskopie.....	46
5.1.3.	Detekce MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk v embryu pomocí virtual slide mikroskopie .....	47
5.1.4.	Rozlišení genotypu embryí pomocí PCR.....	49
5.2.	Detekce mikrochimérismu indukovaného kojením .....	52
5.2.1.	Detekce MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk ve střevě pomocí light sheet mikroskopie .....	52
5.2.2.	Detekce MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk ve střevě pomocí virtual slide mikroskopie .....	56
6.	Diskuze .....	57
7.	Závěr.....	64
8.	Reference .....	65

## 1. Úvod

Mikrochimérismus je velice zajímavým tématem současného výzkumu. Je definován jako relativně malá populace buněk v rámci organismu s odlišným genetickým pozadím. Tento jev, lze přirozeně pozorovat především během těhotenství jako obousměrnou výměnu buněk mezi matkou a potomkem. Přenesené buňky mohou v těle příjemce přetrvávat i desítky let po narození. Z evolučního hlediska mikrochimérismus vznikl nejspíše ve snaze plodu manipulovat mateřským organismem ve svůj prospěch a zajistit si tak výhodné podmínky pro svůj vývoj.

Přestože tato oblast výzkumu není zatím zcela pochopena, ukazuje se, že mikrochimérická buněčná populace s sebou může přinášet pozitivní i negativní důsledky pro zdraví a imunitní systém příjemce, a proto další studium tohoto jevu má velký potenciál.

Cílem této práce je vytvoření myšího modelu vhodného pro výzkum tohoto fenoménu a jeho následné zhodnocení pomocí pokročilých histologických a mikroskopických metod.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Antigen prezentující buňky

Imunitní systém (IS) udržující integritu a vnitřní homeostázu je důležitou součástí mnohobuněčných organismů. Jde o velice komplexní síť biologických procesů, na nichž se podílí obrovské množství různých typů buněk a molekul. Jeho hlavním úkolem je rozpoznat signály nebezpečí představované patogenními organismy a molekulami, ale také tělu vlastními poškozenými, umírajícími nebo třeba nádorovými buňkami a ty co nejefektivněji eliminovat.<sup>1</sup>

Pro správné fungování imunity jako celku je nezbytné propojení obou jejích složek (části přirozené a adaptivní), které se funkčně setkávají v několika buněčných a molekulárních kontextech. Mezi nejdůležitější „interface“ patří antigen prezentující buňky v čele s dendritickými buňkami schopnými rozpoznat velké množství PAMPs (molekulární vzory typické pro patogeny) v kontextu nebezpečí (DAMPs – molekulární vzory asociované s nebezpečím). PAMPs, jsou evolučně vysoce konzervované (LPS, peptidoglykany, flagelin, dsRNA apod.). Repertoár receptorů rozpoznávajících patogeny (PRRs) je kódován v DNA a během života zůstává stejný.

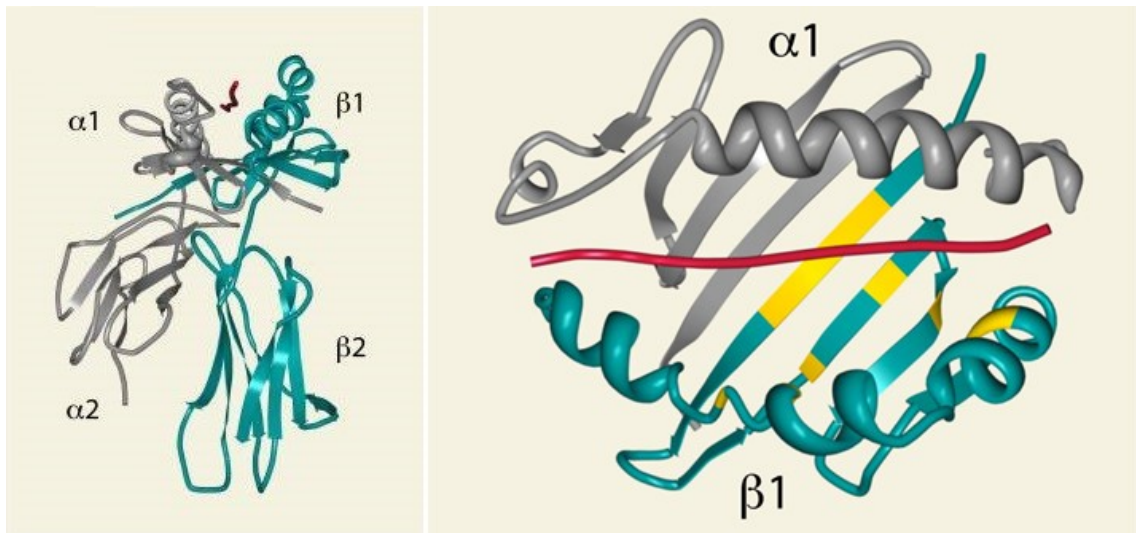
APC na svém povrchu vystavují antigeny (fragменты pohlcených proteinů) v kontextu MHC II molekul a v sekundárních lymfatických orgánech je prezentují zralým T lymfocytům. Ty je rozpoznávají svými antigenně specifickými receptory (TCR) a koreceptory (CD4<sup>+</sup>). V případě, že jsou na povrchu zároveň exprimované kostimulační molekuly (CD86/CD28) dojde k proliferaci T lymfocytů, diferenciaci na efekторы a produkci specifických cytokinů. Bez kostimulace nejsou T lymfocyty schopné diferenciaci v efektorové buňky a dochází k jejich anergii nebo apoptóze. Cytokinové prostředí, ve kterém k aktivaci T lymfocytů dochází rozhoduje o polarizaci Th odpovědi.

### 2.1.1. Molekula MHC II. třídy

Molekula MHC II. třídy hraje při fungování IS, a především adaptivní imunity nezastupitelnou roli. Umožňuje buňkám přirozené imunity prezentovat antigeny (většinou exogenní, tzn. pocházející z vnějšího prostředí a pohlcené buňkou) pomocným (CD4<sup>+</sup>) T lymfocytům a tím spouštět nebo naopak tlumit antigen specifickou imunitní odpověď.

MHC II je polygenní (různé geny pro MHC II vznikaly genovou duplikací) a většina klasických MHC glykoproteinů se vyznačuje také enormním alelickým polymorfismem. U člověka jsou známy tři různé geny pro MHC II. třídy nazvané HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Geny kódující MHC molekuly se nacházejí v rozsáhlém komplexu, který se u člověka označuje jako hlavní histokompatibilní komplex (HLA) a leží na chromozomu 6. U myši leží na chromozomu 17, označuje se jako H-2 komplex a obsahuje pouze dva izotypy (I-A a I-E). Kromě genů pro MHC tento komplex obsahuje také geny kódující některé složky komplementu, cytokiny (TNF) nebo třeba proteiny teplotního šoku.<sup>2,3</sup>

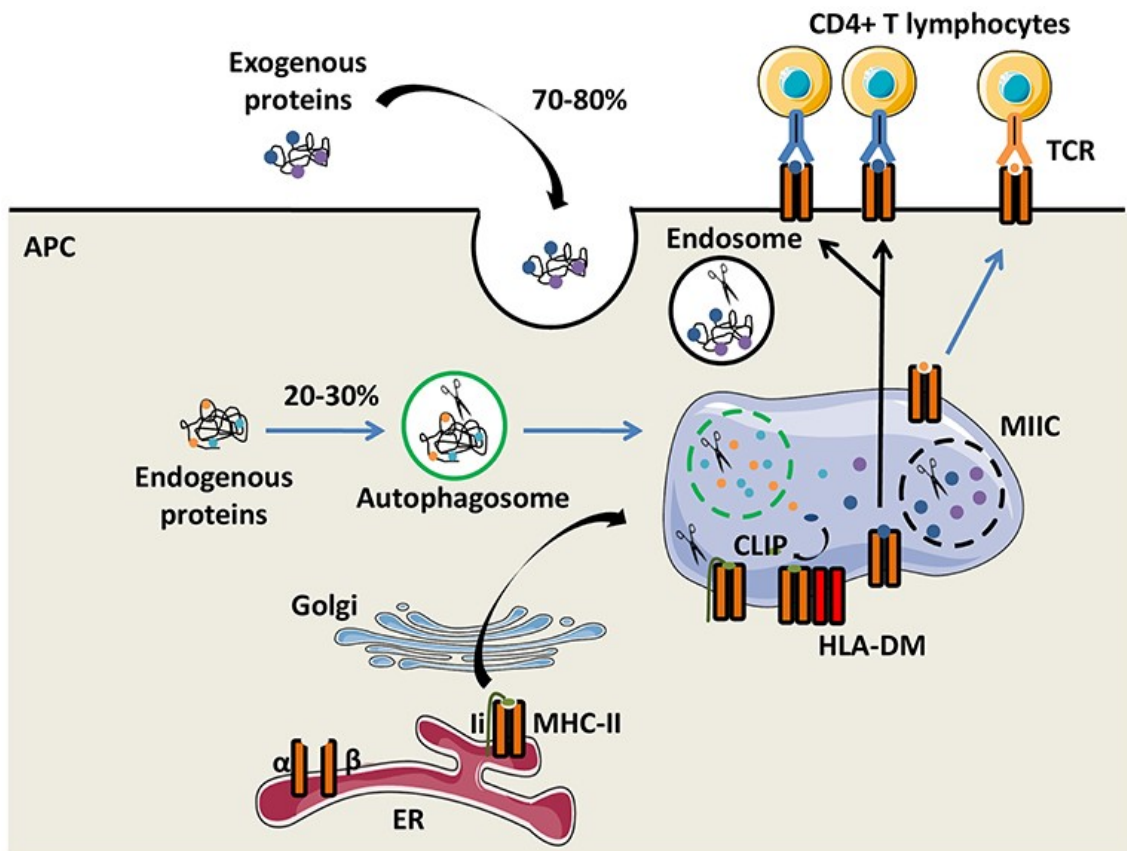
Strukturně se jedná o glykoproteinový heterodimer, který se skládá ze dvou podjednotek –  $\alpha$  a  $\beta$ . Každá z podjednotek obsahuje variabilní ( $\alpha 1/\beta 1$ ) a konstatní ( $\alpha 2/\beta 2$ ) doménu s transmembránovou částí, která ji ukotvuje do membrány. Variabilní části glykoproteinu (podjednotky  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ) tvoří společně vazebné místo pro antigen (viz obr. 1). Narozdíl od MHC gp I. třídy zde není vazebný žlábek ohraničen a díky tomu se sem mohou vázat delší peptidy přesahující svými konci ven z vazebného místa (optimální délka peptidu je asi 18-20 aminokyselin, ale mohou se vázat i peptidy kratší nebo delší).<sup>4</sup>



**Obr. 1** 3D struktura MHC molekuly II. třídy. Obrázek vlevo znázorňuje pohled z boku na všechny části MHC gp II. třídy (tzn. podjednotky  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  tvořící vazebný žlábek a podjednotky  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  s transmembránovou částí). Na obrázku vpravo je vidět pohled shora na vazebný žlábek (červená čára ukazuje orientaci peptidu ve vazebném místě). Převzato z <sup>5</sup>

Ke vzniku komplexů MHC glykoproteinů II. třídy s peptidovými fragmenty dochází během postupného procesu. Nejdříve jsou v drsném endoplasmatickém retikulu syntetizovány  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce, které dimerizují a vytváří komplexy s transmembránovým proteinem zvaným invariantní řetězec (Ii). Ten funguje jako fyzická bariéra zabraňující, aby se do vzniklého vazebného místa vázaly přítomné endogenní peptidy a zároveň směřuje molekuly MHC II k endozomům.<sup>6</sup> Komplexy následně pokračují klasickou vezikulární sekretorickou dráhou. Projdou Golgiho aparátem a na jeho konci se odštěpí ve formě sekrečních váčků. Váčky během cesty k membráně fúzíjí s pozdními endozomy, obsahujícími proteolyticky naštěpené peptidové fragmenty. Zároveň jsou zde přítomny katepsinové proteázy, které umožní štěpení invariantního řetězce.<sup>7</sup> Po jeho naštěpení ve vazebném místě zůstane navázaný ještě krátký fragment (pozůstatek Ii) označovaný jako CLIP. Tomu, aby mohl být CLIP vyměněn za peptid napomáhá molekula HLA-DM (u myši zvaná H2-DM).<sup>8</sup> Váček nakonec splývá s buněčnou membránou a MHC molekula s navázaným peptidem je vystavena na povrchu, kde může být prezentována T lymfocytům (viz obr. 2). Kromě exogenních peptidů jsou antigen prezentující buňky za určitých podmínek schopné na svých MHC glykoproteinech II. třídy prezentovat také peptidy endogenní. Děje se tak procesem tzv. autofágie, kdy jsou intracelulární proteiny dopraveny do endolysozomální dráhy, kde jsou uvnitř endozomů proteolyticky

naštěpeny.<sup>9,10</sup> Endozomy poté splývají se sekrečními váčky obsahujícími komplexy  $\alpha\beta$ li a dále kopírují cestu popsanou výše.



**Obr. 2** Možné způsoby generování peptidů a jejich vystavení na povrchu buňky v kontextu MHC II. Exogenní, resp. endogenní proteiny jsou nejprve pohlceny a uvnitř endozomu resp. autofagozomu hydrolyticky naštěpeny na peptidové fragmenty. Poté splývají s váčky odvozenými od GA, které obsahují komplexy MHCII s navázaným invariantním řetězcem. Dojde k naštěpení Ii a jeho pozůstatek zvaný CLIP je vyměněn s pomocí molekuly HLA-DM za peptidový fragment. Váček nakonec splyne s plazmatickou membránou buňky a MHCII s navázaným peptidem je vystavena na povrchu. Převzato z<sup>11</sup>.

MHC II je konstitutivně exprimováno především na povrchu tzv. profesionálních antigen prezentujících buněk (APCs), mezi které patří dendritické buňky monocyty, makrofágy a B lymfocyty (míra exprese se může lišit dle aktivačního či diferenciačního stavu buňky). S pomocí různých imunitních regulátorů (např. hlavního prozánětlivého cytokinu – IFN- $\gamma$ ) je možné indukovat expresi této molekuly také na dalších buňkách.<sup>12</sup> Hlavním regulátorem exprese genů MHC II (na úrovni transkripce) je transaktivátor třídy II (CIITA).<sup>13</sup> Mezi buňky hematopoetické vývojové řady, u kterých byla exprese MHC II

zaznamenána patří např. T lymfocyty<sup>14,15</sup>, ILC<sup>16,17</sup>, bazofily<sup>18</sup>, neutrofilů<sup>19</sup> nebo eozinofily.<sup>20</sup>

Exprese MHC II ale byla popsána také u řady buněk, které nemají původ v hematopoetické vývojové linii. Patří mezi ně například střevní epitelální buňky (IEC), které se podílejí na střevní slizniční imunitě a toleranci střevní mikrobioty.<sup>21,22</sup> Dále kortikální epitelální buňky thymu (cTEC) a medulární epitelální buňky thymu (mTEC), které jsou důležité pro správný vývoj T lymfocytů procházejících pozitivní a negativní selekcí.<sup>23</sup> Důležitá je také exprese MHC II na stromálních buňkách lymfatických uzlin (LNSC), které potlačují vznik autoreaktivní TFH (pomocných folikulárních T lymfocytů). Díky tomu se významně snižuje odpověď B lymfocytů na autoantigeny v germinálních centrech a je podpořena periferní tolerance.<sup>24</sup>

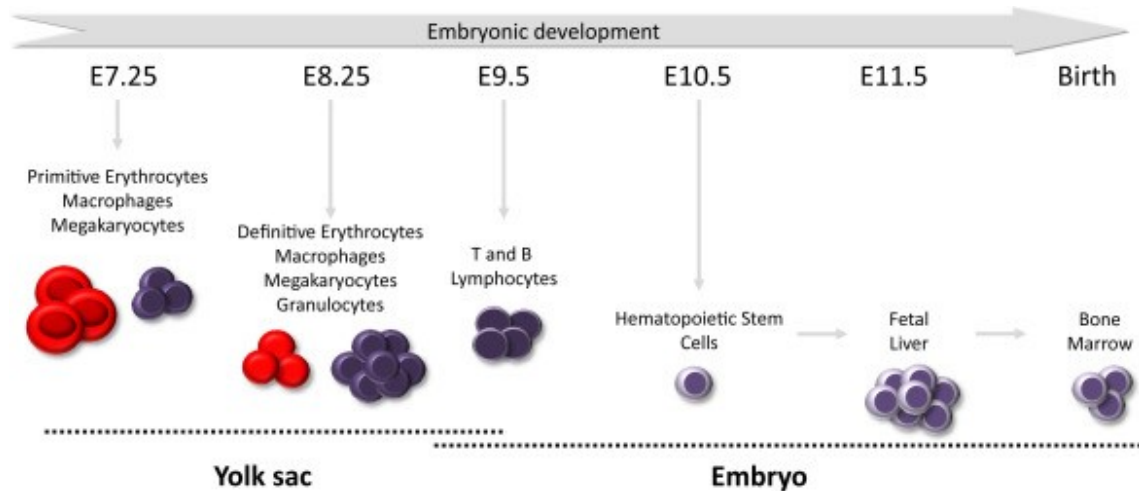
## 2.2. Vývoj imunitního systému

Vzhledem k tomu, že imunitní systém je velice komplexní soustava buněk, orgánů, fyzických i chemických bariér a rozpustných molekul, zaměřím se konkrétně na vývoj hematopoézy a jednotlivých typů imunitních buněk, což souvisí s tématem mé práce.

Buňky imunitního systému jsou nejenom nezbytnou složkou obrany proti patogenům po celý život, ale mnohé z nich hrají také velmi důležitou roli už během prenatalního vývoje. Během tohoto období je například velké množství fagocytujících buněk přítomno v místech aktivní přestavby tkání (například během vývoje končetin a prstů).<sup>25,26</sup> V těchto oblastech přirozeně dochází ve velké míře k programované buněčné smrti a fagocytující buňky mají za úkol tyto mrtvé buňky/debris co nejrychleji odstraňovat. Navíc produkují cytokiny a růstové faktory, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk různých orgánů vyvíjejícího se zárodka. Podílí se například na produkci erythropoetinu – hlavního růstového faktoru červených krvinek. Tím podporují erytropoézu nezbytnou pro okysličování tkání rapidně se zvětšujícího embrya.<sup>27</sup> V závislosti na konkrétním období/fázi vývoje se hematopoéza realizuje v různých prostorově oddělených částech



embrya (viz obr. 3). Imunitní buňky vznikají tedy v embryu velmi časně, a to ještě před tím, než se objeví první hematopoetické kmenové buňky (HSC – hematopoietic stem cell).



**Obr. 3** Postupný přesun hematopoézy během jednotlivých fází embryonálního vývoje myši. Základem hematopoézy jsou progenitory tvořené v extraembryonální tkáni (žloutkovém váčku). Ty jsou později nahrazeny multipotentními hematopoetickými kmenovými buňkami, které jsou produkovány nejdříve fetálními játry (hlavní hematopoéza embrya) a později v kostní dřeni, která je zodpovědná za udržování krevetvorby po celý zbytek života jedince. Schéma znázorňuje lokalizaci a embryonální den, ve kterém začíná produkce jednotlivých progenitorů. Převzato z<sup>28</sup>

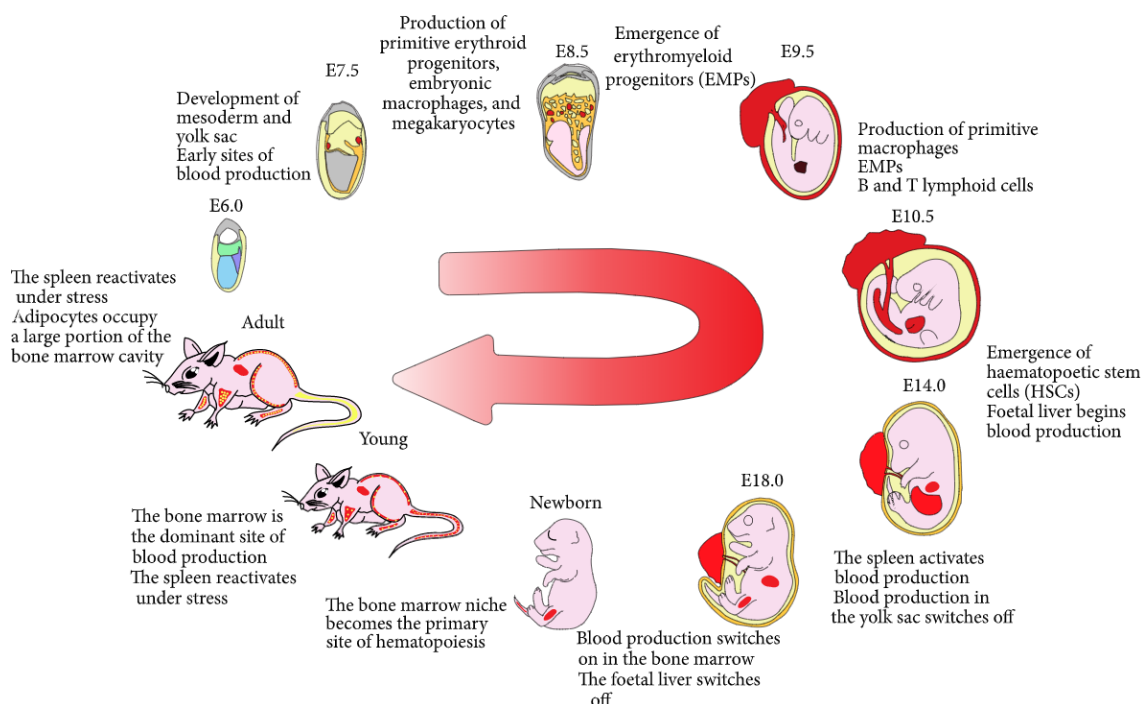
Během gastrulace, která u myši začíná embryonálním dnem 6,75 (E6,75) a u člověka třetím týdnem prenatalního vývoje<sup>29</sup> migrují buňky primitivního proužku dovnitř a dávají tak vzniknout vrstvám endodermu a mezodermu.<sup>30</sup> Z buněk extraembryonálního mezodermu primitivního proužku vznikají hemangioblasty – společné prekurzory buněk krve a endotelu. Ve stádiu E7,25 se ustavuje první (primitivní) hematopoéza v místech, kde hemangioblasty, které migrují do žloutkového váčku (YS – yolk sac) vytvoří krevní ostrůvky.<sup>31</sup> V této fázi vznikají progenitory primitivních erytroidních buněk – erytroblasty (ty se od definitivních erytrocytů liší především tím, že obsahují jádro a syntetizují hemoglobin embryonálního typu).<sup>32</sup> Zároveň se začínají tvořit progenitory megakaryocytů<sup>33</sup> spolu s primitivními monopotentními progenitory makrofágů.<sup>34</sup>

Počínaje stádiem E8,25 nastává druhá fáze („vlna“) vývoje krevních buněk (tzv. „přechodná definitivní hematopoéza“). Z homogenního endotelu žloutkového váčku se začínají vytvářet erytro-myeloidní (EMPs) a následně okolo E9-E9,5 i lymfo-myeloidní (LMPs) prekurzory. EMPs jsou schopné diferenciaci na definitivní progenitory erytrocytů

(exprimují již hemoglobin dospělého typu), celou řadu buněk myeloidní linie<sup>35,36</sup>, a jsou důležitým zdrojem tkáňových makrofágů. Během této fáze také začíná bít embryonální srdce, takže vznikající buněčné prekurzory jsou unášeny krevním tokem a dostávají se do dalších tkání. Zároveň se tím ale značně znesnadňuje možnost identifikovat původ jednotlivých cirkulujících buněk. Z toho důvodu se v některých studiích používají embrya myši *knockout* linie *Ncx1<sup>-/-</sup>*, jejichž srdce není schopné začít pracovat a pohánět krevní cirkulaci.<sup>37,38</sup> Od embryonálního dne 8,5 EMPs ve žloutkovém váčku vznikají prekurzory makrofágů („pre-makrofágy“ - pMacs), které rychle prolifерují, vstupují do krevního řečiště a jsou roznášeny do různých částí embrya. Zde diferencují na trvalé, fenotypově zralé, tkáňové rezidentní makrofágy. Tento „trafficking“ vrcholí okolo embryonálního dne 10,5 a následně množství buněk klesá až v E14,5 nejsou v krevním řečišti detekovatelné žádné z těchto cirkulujících „pre-makrofágů“.<sup>39</sup> Pre-makrofágy v závislosti na exprimovaném chemokinovém receptoru postupně vstupují do tkání embrya. Později, v závislosti na prostředí tkáně, do které vstoupily diferencují na konkrétní typy (např. mikroglie v mozku, Kupfferovy buňky v játrech, Langerhansovy buňky v kůži, alveolární makrofágy v plicích). Z kulovitých prekurzorů se tak stávají typické buňky s výběžky/dendrity. Diverzita tkáňových makrofágů pozorovaná v embryu je srovnatelná s jejich diverzitou v postnatálních tkáních.<sup>40</sup>

LMPs (lympho-myeloid progenitors – rané progenitory lymfomyeloidních buněk) vznikají kromě homogenních endoteliálních buněk žloutkového váčku také uvnitř embrya v místě paraaortální splachnopleury (později oblast AGM – aorta-gonády-mezonefros) a odtud přechází do krevního oběhu. Poté, co tyto progenitory přejdou z krve do brzlíku (a/nebo sleziny), jsou schopné maturovat a zásobit tak organismus veškerými typy embryonálních i dospělých T buněk včetně  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$  T lymfocytů (zahrnujících pomocné  $CD4^+$ , cytotoxické  $CD8^+$ , regulační  $CD4^+FoxP3^+$ , paměťové  $CD4^+CD44^{high}$  a NKT buňky). V brzlíku se nevyskytují kmenové buňky krevní řady schopné samoobnovy, a proto je nezbytné neustále sem dopravovat progenitorové buňky krví<sup>37,41</sup>. Tyto „thymické“ prekurzory mohou dát vzniknout také dendritickým (DC) a NK buňkám, ale vzhledem k tomu, že DC a NK buňky jsou přítomny i v tělech „athymických“ myši musí existovat i další zdroje těchto buněčných populací.<sup>42</sup> Vytváří se také některé populace B lymfocytů jako jsou vrozené B lymfocyty typu B1 a B lymfocyty marginální zóny.<sup>38,43</sup>

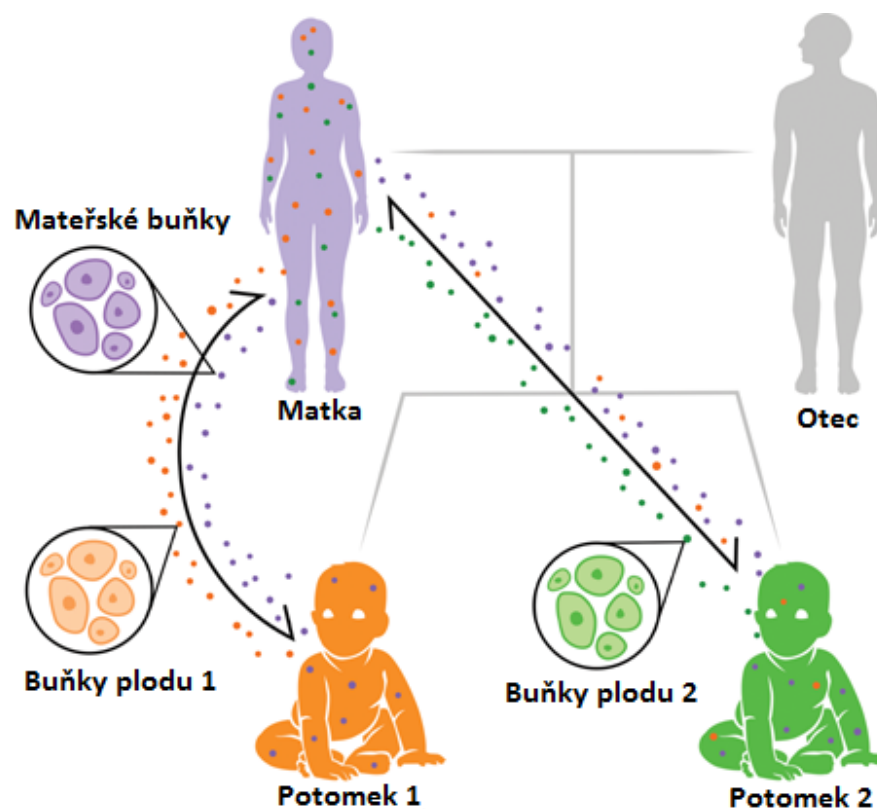
Mezi 10. a 11. dnem po oplození (E10,5) lze zaznamenat počátek produkce hematopoetických kmenových buněk (HSC) v oblasti AGM, které jsou schopné po adoptivním transferu rekonstruovat imunitní systém ozářené dospělé myši.<sup>44</sup> Od E11 je také možné detekovat hematopoetické kmenové buňky (HSCs) pocházející z placenty.<sup>45</sup> Mezi vývojovými stádii E10,5 - E11 začínají hematopoetické kmenové buňky pocházející z YS, AGM oblasti a placenty kolonizovat fetální játra, která tak přebírají úlohu hlavního hematopoetického orgánu a zásobují embryo krevními buňkami až do doby těsně před narozením. Embryonální játra nevytváří krevní buňky *de novo*, ale slouží jako místo expanze a diferenciaci buněk přicházejících z krve. Proto v tomto období rapidně zvětšují svou velikost.<sup>44</sup> Z fetálních jater jsou kolonizovány také brzlík a slezina. Játra tak postupně nahrazují funkci žloutkového váčku, která je utlumována (E14). Od E16,5 začínají jaterní HSC kolonizovat kostní dřeň, která v době těsně před narozením (E18) přebírá úlohu hlavního krvetvorného orgánu a je zodpovědná za krvetvorbu po celý zbytek života jedince (viz obr. 4).



**Obr. 4** Vývoj a anatomické zařazení hematopoézy myši od časného embryonálního vývoje do dospělosti. Krvetvorba začíná v embryonálním stádiu E6 vytvořením mezodermu a krevních ostrůvků žloutkového váčku, odpovědných za první vlnu tvorby krevních buněk. Následně se krvetvorba přesouvá do žloutkového váčku a placenty. Fetální játra a oblast AGM přebírají úlohu hlavního hematopoetického orgánu ve stádiu E10,5 a během E14 se k nim přidává také slezina. Nakonec (E18) se ustaví hematopoéza v kostní dřeni, která plní úlohu hlavního krvetvorného orgánu po zbytek života jedince. Převzato z<sup>46</sup>

### 2.3. Mikrochimérismus

Jako mikrochimérismus (Mc) je označován stav, při kterém je v těle jedince přítomna malá geneticky odlišná populace buněk. Může vznikat různými způsoby. Jednou z možností je vnější zásah jako je transplantace nebo krevní transfúze.<sup>47,48</sup> Fyziologicky (bez vnějších zásahů) navozený mikrochimérismus je typický pro obousměrný transplacentární přenos během těhotenství a také pro následný přenos buněk mateřským mlékem během kojení. Buňky mohou v těle příjemce přetrvávat i dlouho po narození <sup>49,50</sup>, nebo mohou mít pouze krátkodobé účinky.



*Obr. 5 Možné směry migrace mikrochimérních buněk mezi matkou a potomky v těhotenství. Maternální mikrochimérismus (naznačen fialovými tečkami) označuje přechod mateřských buněk do těla potomků. Fetální mikrochimérismus (naznačen oranžovými a zelenými tečkami) označuje přechod buněk plodu do těla matky. Upraveno podle<sup>51</sup>*

Podle genetického původu buněk podílejících se na tomto jevu a směru jejich migrace rozlišujeme během těhotenství několik typů mikrochimérismu (viz obr. 5). Prvním z nich je mikrochimérismus fetálně-maternální, který je ustavován migrací

fetálních buněk do těla matky a v průběhu těhotenství se jeho hladina zvyšuje.<sup>52</sup> Jde o zřejmě nejvíce prostudovaný typ mikrochimérismu a existuje mnoho studií zabývajících se jeho pozitivním i negativním dopadem na zdraví matky. Mateřský imunitní systém je během těhotenství vystaven množství otcovských alloantigenů přicházejících z plodu a je nezbytné vytvořit vůči nim (a tedy i plodu) toleranci, alespoň do doby, než se plod stihne dostatečně vyvinout. Fetální buňky nejspíše mohou podporovat expanzi mateřských regulačních T lymfocytů (Tregs), které tlumí imunitní reakci matky vůči plodu.<sup>53</sup> Možná role fetálního mikrochimérismu byla popsána také v řadě onemocnění jako jsou nádorová nebo autoimunitní<sup>54,55</sup>, ale porozumění jejich přesné funkci v této oblasti bude vyžadovat další výzkum. Je známa také schopnost fetálních buněk migrovat do poškozených tkání matky, diferenciovat na různé buněčné typy<sup>56,57</sup> a přispívat k opravě poškození.<sup>56</sup> Tento typ mikrochimérismu byl široce distribuován v orgánech myši i člověka v různých fázích těhotenství. Nejvíce byl zastoupen v plicích, ale byl prokázán také ve slezině, srdci, ledvinách, štítné žláze, lymfatických uzlinách nebo kůži.<sup>58,59</sup>

Dalším typem je mikrochimérismus maternálně-fetální, který je přesně opačný - tzn. mateřské buňky přechází do těla potomka a platí to i přes generaci (buňky matek se přenáší na vnuky). Aby mohlo být těhotenství úspěšné je nezbytné navodit také toleranci plodu vůči matce. Imunitní systém plodu v děloze je během těhotenství vystaven značnému množství nezděděných maternálních antigenů (NIMAs), na které se vytváří tolerance.<sup>60</sup> Přetrvávající postnatální tolerance vůči NIMAs může vést ke snížení citlivosti k Rh antigenům u Rh<sup>-</sup> žen, které se narodily Rh<sup>+</sup> matkám a může mít také dopad na výsledek transplantace.<sup>61-63</sup> Tolerance plodu vůči matce může být indukována ještě dalším způsobem. Některé mateřské APC jsou schopné procházet placentou a migrovat do sekundárních lymfatických orgánů plodu, kde přispívají k produkci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs. Tyto regulační buňky potlačují imunitní reakci plodu vůči matce a přetrvávají v organismu do dospělosti.<sup>64</sup> Na maternálním mikrochimérismu se podílí i celá řada dalších buněčných populací, které mohou mít různé vlivy na zdraví potomka a mohou přetrvávat v jeho těle i roky po narození.<sup>65</sup> Mezi prokázané buněčné populace, které se podílejí na maternálním mikrochimérismu (objevené u dospělých zdravých žen) patří T lymfocyty, B lymfocyty, monocyty/makrofágy, NK buňky.<sup>50</sup> U lidských embryí ve druhém trimestru těhotenství byla prokázána přítomnost mateřských

T a B lymfocytů, CD34<sup>+</sup> buněk a CD45<sup>+</sup> buněk<sup>66</sup> Maternální buňky byly distribuovány v mnoha různých orgánech potomka jako jsou plíce, thymus, játra ledviny, srdce, slezina a další.<sup>67</sup> Na existenci maternálního mikrochimérismu by měl být brán zřetel při studiu fenotypu geneticky modifikovaných organismů. Například původně publikovaný myš *knockout* pro IL-2 měl velice limitovaný fenotyp. Provedená reevaluační studie ukázala, že za ztrátu fenotypu jsou odpovědné maternální mikrochimerní buňky, které jsou schopné zajistit dostatečnou hladinu IL-2 u mláděte.<sup>68</sup>

Je znám také mikrochimérismus fetálně-fetální, kdy buňky přechází mezi plody navzájem během jednoho vícečetného těhotenství nebo ze starších sourozenců (z dřívějších těhotenství) do těla mladšího v následném (aktuálním) těhotenství.<sup>69</sup>

Mikrochimérismus vzniká také přenosem mateřských buněk během kojení. Kojením se navíc prodlužuje doba vystavení potomka NIMAs, což podporuje přetrvávání maternálního mikrochimérismu v těle potomka až do dospělosti.<sup>60</sup> Buňkám obsaženým v mateřském mléce a jejich přechodu do orgánů kojenců se věnuji v následující kapitole („Mléko jako imunomodulans“).

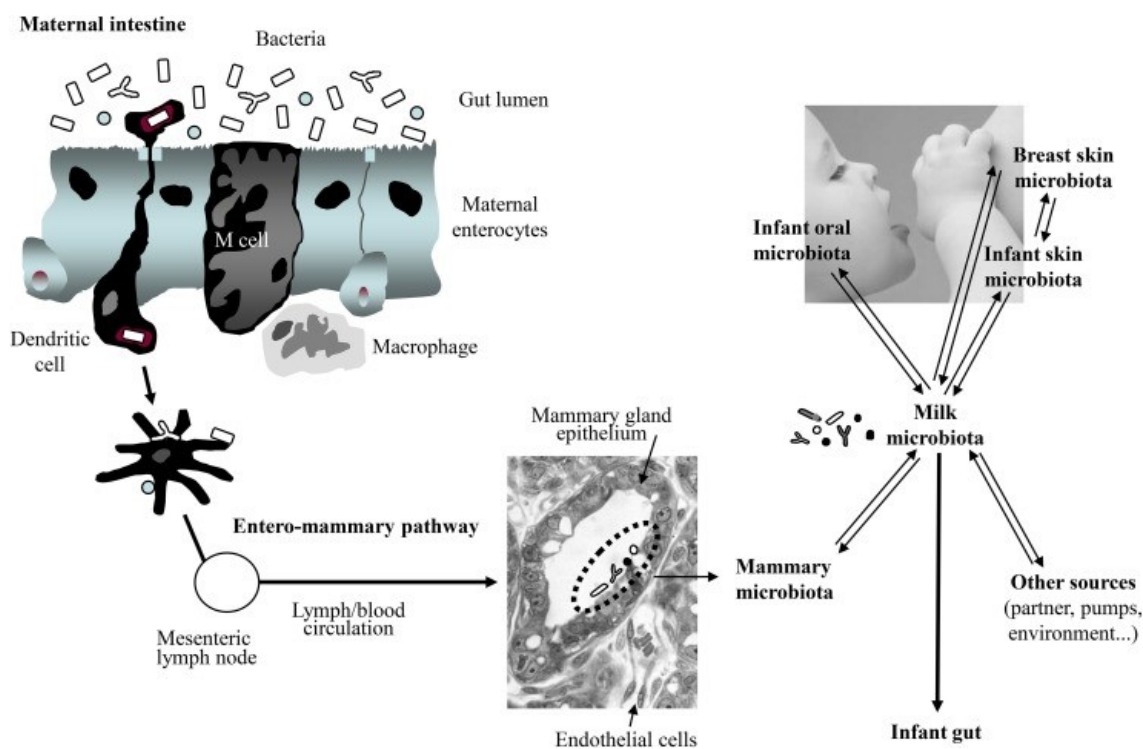
## **2.4. Mléko jako imunomodulans**

Pro novorozence je mateřské mléko nenahraditelné především svou nutriční rolí. Jeho složení prošlo dlouhým evolučním vývojem a je unikátní pro každý druh savce (tak splňuje specifické požadavky na výživu u všech druhů). Kromě toho, že kojenci poskytuje většinu živin potřebných k jeho správnému růstu, obsahuje také různé druhy buněk a velké množství biologicky aktivních látek, které mimo jiné pomáhají rozvíjet imunitní systém. Složení mateřského mléka se navíc v průběhu času dynamicky mění a přizpůsobuje se tak potřebám rostoucího/vyvíjejícího se potomka.

První sekret produkovaný mléčnou žlázou (kolostrum), který novorozenec přijímá první dny po narození, obsahuje méně tuků, více cukrů a hlavní obsaženou proteinovou komponentou je syrovátka. Na rozdíl od kaseinu, který je v mléce více zastoupen až v pozdější fázi kojení a při kontaktu s žaludečními kyselinami vytváří pevnou sraženinu, zůstává syrovátka tekutá a je tak snadněji stravitelná.<sup>70,71</sup>

Další důležitou složkou mateřského mléka jsou tzv. oligosacharidy získané z mateřského mléka (HMOs – human milk oligosaccharides). Pro kojence jsou tyto molekuly nestravitelné a díky tomu se dostávají až do tlustého střeva, kde pomáhají utvářet vhodný střevní mikrobiom. Nejenom podporují růst některých prospěšných střevních bifidobakterií, které jsou schopné HMOs metabolizovat, ale mají také schopnost vázat povrchové receptory patogenů, a tak zabraňovat jejich vazbě na epitelové buňky střeva. Schopnost metabolizovat HMOs mají druhy bifidobakterií typických pro střevní mikrobiom kojenců. Po ukončení kojení a změně stravy se složení mikrobiomu změní a množství bakterií schopných HMOs metabolizovat významně klesá<sup>72,73</sup>

Vznik a postupná sukcese různých typů mikrobioty konkrétního jedince, který tráví svůj prenatální vývoj ve sterilním prostředí je velice důležitý pro jeho optimální fyziologické nastavení. Během porodu a krátce po něm (pokud nezajistíme striktně sterilní prostředí) dochází k inokulaci v podstatě všech tělních povrchů živými komenzálními bakteriemi. Ty se standardně nacházejí mimo jiné na pokožce matky, odkud se dostávají do ústní dutiny potomka a odtud se mohou během kojení přenést buďto přímo do zažívacího traktu potomka nebo retrográdním tokem do mléčné žlázy, odkud se poté uvolňují do mléka.<sup>74,75</sup> Tato cesta ale nevysvětluje například přenos bifidobakterií, které jsou striktně anaerobní a jejich výskyt na pokožce není pravděpodobný.<sup>76,77</sup> Navíc některé druhy bakterií byly identifikovány v kolostru, ještě před začátkem kojení a nemohlo tedy dojít ke kontaminaci mléčné žlázy tímto způsobem.<sup>78</sup> Musí proto existovat i jiný způsob přenosu komenzálních bakterií a bifidobakterií a tím je přenos ze zažívacího traktu matky tzv. enteromamární cestou (viz obr. 6). Některé studie ukazují, že střevní DCs (a jiné mononukleární buňky) jsou schopné pohltit v lumen střeva komenzální bakterie, a i několik dní je v sobě uchovat živé.<sup>75,79</sup> Díky tomu je možné, aby tyto bakterie překročily střevní bariéru, a přitom nespustily nežádoucí silnou imunitní reakci, která by vedla k poškození tkáně. DCs poté mohou projít do mezenterální uzliny a odtud (lymfou a/nebo krví) do mléčné žlázy, ze které mohou být během kojení přeneseny do střev kojence a ta osídlit.<sup>76,80</sup>



*Obr. 6 Znáznornění možného přenosu střevní mikrobioty ze střeva matky do těla potomka během kojení tzv. enteromamární cestou. Převzato z<sup>81</sup>*

Ustavení/zřízení vhodné/správné střevní mikrobioty je klíčové pro rozvoj střeva a imunitního systému a může mít výrazný dopad na zdraví jedince později během života. Různé bakteriální kmeny mohou směřovat imunitní reakci jiným směrem (k Th1 vs Th2 nebo Treg) a proto je kolonizace střeva různými druhy bakterií klíčová pro vyladění vyvíjejícího se imunitního systému.<sup>82</sup> Nevhodný vývoj složení střevní mikrobioty v raném věku bývá spojován s rozvojem alergií a dalších poruch imunity/onemocnění.<sup>83,84</sup>

Mateřské mléko je také zdrojem esenciálních mastných kyselin (kyseliny linolové a  $\alpha$ -linolenové). Ty fungují jako prekurzory polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které jsou nepostradatelnou složkou buněčných membrán a jsou velice důležité při rozvoji zraku a kognitivních funkcí mozku.<sup>85,86</sup> (Kromě prekurzorů mohou být mlékem dodávány také přímo hotové polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem - kyselina arachidonová a kyselina dokosaheptaenová).

Z mléčné žlázy se do mléka uvolňuje také široké spektrum cytokinů<sup>87</sup> jejichž složení se mění (kolísá/fluktuuje den vs noc a kolostrum vs vyzrálé mléko), chemokinů<sup>88</sup>



a růstových faktorů<sup>89</sup>. Plazmatické buňky mléčné žlázy produkují a uvolňují do mléka protilátky. Jde o hlavní zdroj protilátek u kojenců a vzhledem k nevyzrálosti imunitního systému také o důležitou část imunitní obrany. U některých druhů savců (ne u člověka – ale např. u hlodavců) jsou protilátky (IgG) ze střeva transportovány přes střevní epitel do cirkulace (enterocyty v oblasti dvanáctníku a lačnicku/ duodena a jejuna exprimují na svém povrchu Fc receptor díky kterému je usnadněna transcytóza imunoglobulinu).<sup>90</sup> Jedním z hojně zastoupených izotypů je IgA, jehož hlavním úkolem je ochrana sliznic (váže se na povrchy sliznic a tím zabraňuje navázání patogenů). Jde nejčastěji o dimer spojený J řetězcem s navázanou sekreční komponentou (pozůstatek po polyIgR = sekreční IgA/sIgA). IgA je produkován plazmatickými buňkami, které přešly enteromamární cestou ze střeva do mléčné žlázy (proto jsou namířené typicky proti patogenům, se kterými se setkal imunitní systém střeva matky – a je pravděpodobné, že se s nimi setká i potomek)<sup>91,92</sup>. Druhým nejvíce zastoupeným izotypem je IgM. Ten je přenášen ve formě pentameru, obsahuje sekreční komponentu a stejně jako sIgA je významný v ochraně sliznic.<sup>92</sup>

Kojením se přenáší také množství buněk a jejich počet se v průběhu laktace mění. Nejvyšší koncentrace mateřských buněk je v kolostru, což odpovídá větší závislosti nevyzrálého imunitního systému kojence na možném přísunu maternálních buněk pro optimální rozvoj imunitního systému, popř. pro imunitní reakci samotnou. Leukocyty v této fázi kojení představují 13 % - 70 % všech buněk v mléce. Jejich množství během prvních dvou týdnů klesá a ve vyzrálém mléce tvoří pouze 0 % - 2 % všech mléčných buněk. Uvedená množství se ale mohou měnit například vlivem infekčního onemocnění matky a/nebo dítěte.<sup>93</sup> V mateřském mléce byly popsány populace makrofágů/monocytů, lymfocytů a dalších buněk, včetně regulačních T lymfocytů,  $\gamma\delta$  T buněk, NKT buněk (natural killer T cells), NK buněk (natural killer) nebo ILC (innate lymphoid cells).<sup>94–98</sup> Některé z nich jsou schopné přejít ze zažívacího traktu kojence do krevního oběhu a tím se dostat do vzdálených orgánů, které osídlí.<sup>99,100</sup> V mateřském mléce jsou obecně nejhojnější populací buňky myeloidní linie. Ve vyzrálém mléce tvoří 40 % - 50 % všech buněk makrofágy podobně jako neutrofilů, zatímco množství lymfocytů se pohybuje mezi 5–20 %.<sup>101</sup> T lymfocyty jsou pak početnější než B lymfocyty (asi 80 % lymfocytů jsou zde T lymfocyty). Z nich jsou 25 % zastoupeny CD4<sup>+</sup> a

75 % CD8<sup>+</sup> T buňky. CD8<sup>+</sup> T lymfocyty exprimují na svém povrchu chemokinový receptor CCR9 a integrin  $\alpha 4\beta 7$ , které je navádí do Peyerových plátů ve střevě a zde mohou potenciálně pomoci nezralému imunitnímu systému v obraně proti orálně přeneseným patogenům, kterým je neustále vystaven.<sup>100</sup> Byla prokázána také přítomnost kmenových buněk v mateřském mléce a uvažuje se o jejich možném terapeutickém využití, popř. o jejich možné fyziologické funkci při kompenzaci patologického fenotypu kojence.<sup>102</sup> U kmenových buněk mateřského mléka byla například popsána schopnost migrace do mozku kojenných mláďat myši, kde diferencovaly na neurony a gliové buňky<sup>103</sup>

## **2.5. Metody pro detekci mikrochimérismu**

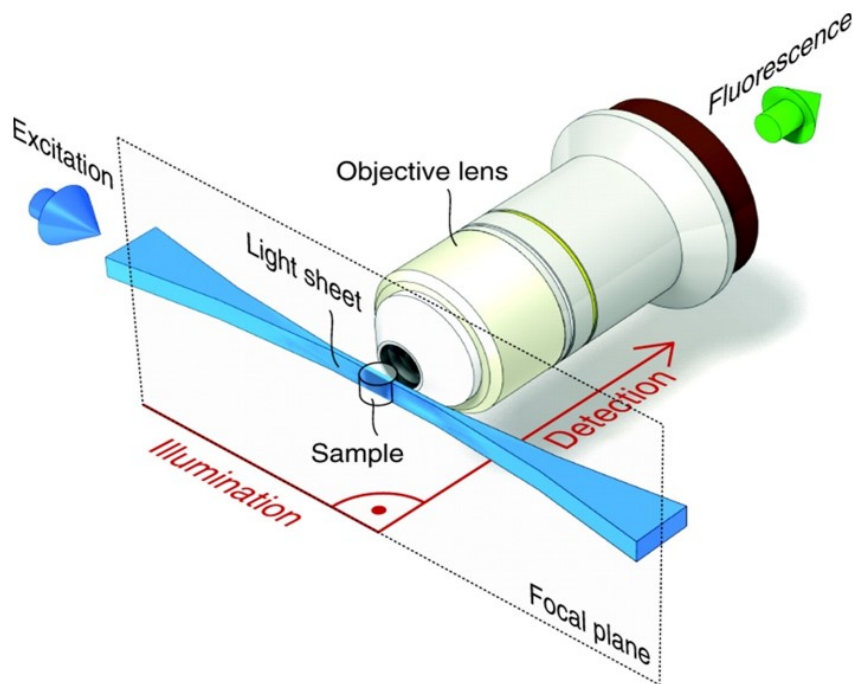
Pro detekci mikrochimérismu jsou využívány různé technologie s různými výhodami a omezeními. Jednou z nich je například fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která v kombinaci s mikroskopií umožňuje zároveň určení lokalizace buněk ve tkáni. Je ale založená na detekci chromozomu Y na genetickém pozadí matky, takže je omezena pouze na zkoumání fetálního mikrochimérismu u matek synů.<sup>104</sup> Já jsem se rozhodla využít pro své experimenty kombinaci průtokové cytometrie a dvou následujících mikroskopických přístupů se speciálním níže popsaným myším modelem.

### **2.5.1. Light sheet mikroskopie**

Light sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM) je nedestruktivní metoda, která v současné době zažívá bouřlivý rozvoj. Tento mikroskopický přístup je vhodný pro zobrazování celých orgánů, tkání i organismů, a to za předpokladu, že jsou transparentní/průhledné nebo dobře projasněné pomocí tzv. clearovacích metod. Tento druh mikroskopie poskytuje uživatelům velké množství výhod. Na rozdíl od klasické wide field i skenovací fluorescenční mikroskopie, pro které se musí vytvářet řezové preparáty, kvůli omezené možnosti proostřit tlustší preparát (omezení na cca 100  $\mu\text{m}$ , u více fotonové mikroskopie násobky 100  $\mu\text{m}$ ), je možné pomocí light sheet mikroskopie snímat přímo celé orgány a tkáně (v některých případech celé organismy, např. myší embrya).<sup>105</sup> Light sheet mikroskop je schopen provádět optické řezy celým preparátem o velikosti nad 1 mm. Díky

tomu nedochází k deformaci vzorku, vzorek obsahuje všechny struktury a podává přesnou informaci o uspořádání tkáně *in situ*. Díky značně omezené fototoxicitě nabízí i možnost snímat *in vivo*. Jak již bylo zmíněno, tyto ryze optické řezy jsou mimořádně vhodné pro 3D rekonstrukci (popř. 4D – pokud je proveden časosběrný záznam). Při přípravě vzorků pro jiné druhy mikroskopie je třeba tkáňové vzorky nařezat (mikrotom, kryotom, vibratom), při tom vznikají artefakty (tkáň se trhá, roluje a jinak deformuje) a výsledná 3D rekonstrukce je tedy problematická.

Osvětlení preparátu u klasické fluorescenční mikroskopie je příliš intenzivní a je doprovázeno světelným poškozením vzorku. Light sheet mikroskopie využívá k osvětlení vzorku excitační laser/paprsek vytvarovaný pomocí speciálních čoček do tenké plochy kolmé k objektivu (tenká plocha nebo také „list světla“, odtud anglický název light sheet – viz obr. 7). Tak osvětluje selektivně pouze konkrétní rovinu ostrosti, nedochází k vysvícení fluoroforů mimo ni a je minimalizován fotobleaching a fototoxicita ve srovnání s klasickou fluorescenční mikroskopií.<sup>106</sup> Kamera v tomto mikroskopu navíc umožňuje wide-field detekci, díky čemu je možné nasnímat vzorek velmi rychle a není tak vystaven příliš velkému osvětlení. Nevýhodou této technologie je delší doba nutná na přípravu vzorku (clearing) a také může být problematické barvení (prostupnost reagensů v 3D, dlouhé promývací kroky, možnost vymytí vitálních sond – PKH, ovlivnění fluorescence fluorescenčních proteinů chemií clearingových roztoků – např. močovina).



**Obr. 7** Ilustrace light sheet mikroskopu. Modrá šipka znázorňuje jeden ze dvou excitačních paprsků (umístěných naproti sobě). Ty vytváří tenký list světla (na obrázku světle modrý), který prochází vzorkem. Kolmo na něj je umístěn detekční objektiv, který snímá vyzářenou fluorescenci (zelená šipka).<sup>107</sup>

Light sheet mikroskopie není jedinou nedestruktivní zobrazovací možností. Je možné aplikovat např. CT, MRI (menší rozlišení), v omezené míře i konfokální a vícefotonovou mikroskopii (LSFM zobrazuje tlustší vzorky,  $i > 1\text{cm}$ ). Ve všech případech se jedná o metodu nejrychlejší, ale příprava vzorků pro LSFM (aplikace projasňovacích metodik) není finančně náročná, náklady se však mohou výrazně navýšit spotřebou většího množství fluorescenčních sond a protilátek při dlouhé inkubační době, kterou vyžaduje značení objemných objektů. LSFM se stala v podstatě revoluční technologií pro pochopení časného vývoje řady modelových organismů (*Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*).<sup>108–111</sup>

### 2.5.2. Virtual slide mikroskopie

Light sheet mikroskop však není aplikovatelný ve všech případech. Není např. schopen zobrazit příliš tlusté, těžko projasnitelné tkáně nebo orgány (obsahující např. velké množství tukových kapének, mezibuněčné hmoty, popř. některých barviv – melanin, cytochromy). Proto, pokud se chceme zabývat kvantitativní histologií a 3D rekonstrukcí, můžeme využít i tzv. virtual slide mikroskopii, která umožňuje vysoce rychlou a efektivní virtualizaci mnoha řezových preparátů. Současné přístroje, např. mnou využitý Axio Scan.Z1 mají tu výhodu, že snímají v automatickém módu. Díky tomu je možné nastavit parametry snímání několika desítek preparátů (sklíček) obsahujících stovky řezů a přístroj je schopen mnohahodinové samostatné práce, kdy je možné se věnovat přípravě dalších preparátů, popř. analýze dat. U této technologie odpadá nutnost dlouhých inkubací při přípravě preparátů, je možné využít stejného portfolia značících technik, jako u klasické fluorescenční mikroskopie. 3D rekonstrukce je však problematická kvůli ztrátě části informace v místě řezu (tkáň se různě deformuje a může docházet ke ztrátě buněk). Nutná je komplexní korekce na individuální deformaci jednotlivých řezů. Oproti LSFM má virtual slide mikroskopie samozřejmě větší rozlišení a daleko větší všestrannost nastavení a parametrů. Jeho využití je vhodné pro mnoho oblastí výzkumu včetně imunologie<sup>112</sup>, vývojové biologie<sup>113</sup>, nádorové biologie<sup>114</sup>, neurověd<sup>115</sup> a dalších.

### 2.5.3. MHCII/EGFP knock-in myší model

MHC II-EGFP *knock-in* myší model je velmi cenným nástrojem pro studium buněk exprimujících MHC II. třídy a jejich rolí v imunitním systému. Tento *knock-in* myší model je imunologicky funkčně nerozeznatelný od 129/Sv; H-2b (wt) kmene myši, od kterého byly odvozeny. Překvapivě tedy nevykazují žádný fenotyp a to přesto, že velikost připojeného GFP je obdobná jako velikost původního samotného  $\beta$  řetězce a teoreticky by mohla (pokud takové existují) ovlivňovat jeho interakce s cytosolickými signalizačními a adaptorovými molekulami. Na rozdíl od wt kmene jsou tedy všechny buňky exprimující MHC II v tomto *knock-in* modelu značeny zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Ten díky svým fluorescenčním vlastnostem představuje významný reportérový protein pro

sledování genové exprese, zvláště s ohledem na buněčnou lokalizaci, a to i za *in vivo* podmínek. Dalším výhodou tohoto modelu je to, že je možné získat informaci jak o povrchové, tak intracelulární lokalizaci MHC II. třídy bez artefaktů způsobených nespecifickou vazbou protilátek, popř. fixací a permeabilizací.

O významu této molekuly svědčí i to, že za objev, výzkum a rozvoj využití zeleného fluorescenčního proteinu získali v roce 2008 O. Shimomura, M. Chalfie a R.Y. Tsien Nobelovu cenu za chemii. Zelený fluorescenční protein se skládá z 238 aminokyselin dlouhého řetězce a byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria*. Excitační maximum proteinu má vlnovou délku 395 nm, emisní maximum pak je 509 nm. Pomocí modrého světla můžeme tedy přímo excitovat zelenou fluorescenci buněk obsahujících tento protein (není potřeba žádného přídatného enzymu nebo kofaktoru, pouze přítomnost O<sub>2</sub> nezbytného pro vytvoření kovalentní struktury absorpčního centra fluoroforu) a následnou emisi pak zachytit pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo průtokového cytometru, popř. fluorimetru.<sup>116</sup>

Konkrétní *knock-in* model, který byl využit pro experimenty v této diplomové práci místo původního GFP *Aequorea victoria* využívá cílenými mutacemi uměle vytvořený EGFP (enhanced green fluorescent protein). Ten obsahuje oproti GFP dvě bodové mutace, což způsobuje, že má vyšší intenzitu fluorescence a tím pádem je mnohem lépe detekovatelný než původní varianta GFP.<sup>117</sup> *Knock-in* model vznikl genetickou manipulací embryonálních kmenových buněk získaných z 129/Sv; H-2b kmene myši, a to nahrazením genu pro MHC II genem kódujícím MHC II s intracelulárně navázaným EGFP na intracelulárním C-konci  $\beta$ -řetězce. Velkou výhodou tohoto myšího modelu je možnost relativně snadno vizualizovat buňky exprimující MHCII molekuly (na povrchu i v rámci intracelulárního sekretorického i endocytického váčkového systému). Díky tomu není nutné značit buňky/tkáně/orgány pomocí imunohistochemických technik vyžadujících vesměs aplikaci fixačních a permeabilizačních metodik, které v kombinaci s použitím protilátek vedou ke vzniku celé řady experimentálních artefaktů. Dalším omezením klasických histologických barvicích technik (včetně fluorescenční imunohistochemie) je jejich časová náročnost a fakt, že v řadě případů je možné efektivně probarvit pouze určitou tloušťku tkáně, což je překážkou pro některé technologie jako je například light

sheet mikroskopie, která umožňuje zobrazovat celé tkáně a orgány, popř. celé organismy bez nutnosti mechanického řezání.<sup>118</sup>

### 3. Cíle

- optimalizovat metody a vyvinout model pro studium maternálního mikrochimérismu s využitím pokročilých histologických technik
- zjistit jaké typy a jaká množství APC buněk přispívají k maternálnímu mikrochimérismu
- pokusit se o histologickou kvantitativní analýzu maternálního buněčného mikrochimérismu kombinací pokročilých mikroskopických a bioinformatických technik.



## 4. Materiály a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Chemikálie a roztoky

*Agaróza* – 1-2,5%

*Azid sodný* (Sigma-Aldrich) – 0,01% v PBS

*BFM* – 130mM EDTA, 0,12% bromfenolová modř, 50% glycerol

*Cryomount* (zalévací médium pro zamrazené řezy; Histolab AB)

*Dispáza* (Gibco) - 1mg/ml v HBSS

*DNA ladder* – hmotnostní standard (Thermo scientific)

*DNA polymeráza* (TopBio)

*dNTPs* (TopBio) – 10mM

*EDTA* (Sigma-Aldrich) – 2mM; 0,2mM

*Fetální bovinní sérum* (Life Technologies) – 2% v HBSS

*Fluoroshield s DAPI* (Sigma-Aldrich)

*Formaldehyd* (Sigma-Aldrich) – 3,8% v H<sub>2</sub>O

*GelRed* – značení nukleových kyselin (Biotium) – ředěno 15000x

*HBSS bez Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>* (Gibco) – 1x v tkáňové vodě

*HEPES* (Sigma) - 10mM

*Hoechst33258* (Sigma-Aldrich) – 1μg/ml v PBS

*Hovězí sérový albumin* (Sigma-Aldrich) – 1% v PBS

*Lyzační roztok pro izolaci DNA* (Viagen)

*MgCl<sub>2</sub>* (TopBio) – 25mM

*NaOH* (Lachner) - 25mM

*N-TEA* (Sigma-Aldrich)

*PBS* – pH 7,3; 0,79% NaCl (Lachner), 0,29% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Lachner), 0,011% KCl (Penta), 0,031% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema)

*PBS s želatinou* – 0,02% želatina (Sigma-Aldrich) + 0,01% azid sodný (Sigma-Aldrich)

*PCR buffer bez Mg<sup>2+</sup>* (TopBio) – 10 x

*Proteináza K* (Qiagen)

*Sacharóza* (30% v PBS) – Penta

*5x TBE* – 200mM Tris, 10mM EDTA, 450mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v H<sub>2</sub>O

*TEA* (Sigma-Aldrich)

*Tkáňová voda*

*Tris HCl* - 40mM, pH5,5

*Triton X-100* (Sigma-Aldrich) – 0,5% v PBS

*Trypanová modř*

*Urea* (Lachema)

*PCR H<sub>2</sub>O* (Braun)

*Želatina* (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.1.1. Protilátky

*Tabulka 1 Primární protilátky pro imunohistochemii*

Název	Typ	Zdroj	Ředění	Výrobce
CD45	anti mouse	rat	250x	Invitrogen
F4/80	anti mouse	rat	250x	Biologend

*Tabulka 2 Sekundární protilátky pro imunohistochemii*

Typ	Zdroj	Ředění	Fluorofor	Výrobce
anti rat	goat	250x	AlexaFluor 647	Life technologies

*Tabulka 3 Protílátky pro průtokovou cytometrii*

Název	Zdroj	Ředění	Fluorofor	Výrobce
CD19	rat	40x	APC	Biolegend
CD45	rat	300x	Alexa700	Invitrogen
MHCII	rat	1000x	APC-Cy7	Biolegend
F4/80	rat	80x	PE	Biolegend

#### 4.1.1.2. Projasňování tkání

*Tabulka 4 Složení projasňovacího roztoku CUBIC 1*

Reagencie	Množství
dH <sub>2</sub> O	175 ml
Urea (25 wt%)	125 g
N-TEA (25 wt%)	124 ml
Triton X-100 (15 wt%)	70 ml

*Tabulka 5 Složení roztoku CUBIC 2 (původní protokol <sup>119</sup> byl změněn takto).*

Reagencie	Množství
dH <sub>2</sub> O	130 ml
Urea (22,5 %)	125 g
TEA (9 %)	44,5 ml
Sacharóza (45 %)	250 g
Triton X-100 (0,1 %)	380 µl

*Tabulka 6 Složení promývacího roztoku WASH*

Reagencie	Množství
PBS	500 ml
BSA (0,5%)	2,5 g
Azid sodný (0,01%)	500 µl
Triton X-100 (0,1%)	500 µl

#### 4.1.2. Spotřební materiál

*Bürkerova počítací komůrka* (Assistante)

*Destička* - 96 jamek (Costar)

*Injekční stříkačka* – 2ml (Chirana)

*Krycí sklíčka* - 24 x 60 mm (Hirschmann)

*Parafilm* (Sigma-Aldrich)

*Podložní sklíčka* – Superfrost plus (Thermo scientific)

*Petriho misky* (Nunc)

*Sítka* – cell strainer, 40µm (Corning)

*Zkumavky pro FACS* - 1,2ml (Alpha Laboratories)

*Zkumavky* - 0,5ml; 1,5ml; 2ml (Eppendorf)

*Zkumavky* – 15ml; 50ml (Eppendorf)

#### 4.1.3. Přístroje

##### 4.1.3.1. Mikroskopie

*Olympus Cell<sup>R</sup>* (widefield mikroskop)

*Zeiss Axio Scan Z1* (virtual slide mikroskop)

*Zeiss Lightsheet Z.1* (LSFM)

##### 4.1.3.2. Průtoková cytometrie

*BD LSR II* (BD Biosciences)

##### 4.1.3.3. Genotypizace

*Cycler XP* (Bioer)

*Cykler s teplotním gradientem* (Biogener)

*DNA transluminátor TFP-M/WL* (Vilber)

*Elektroforetická vana pro elektroforézu* (Clever scientific)

*Kamera DMK 41AU02* (The Imaging Source)

#### 4.1.3.4. Ostatní přístroje

*Centrifuga mini spin plus* (Eppendorf)

*Centrifuga Universal 16 R* (Hettich)

*Kryostat* (Leica CM 3050 S)

*Laboratorní váhy* (Schoeller instruments)

*Magnetická míchačka* (IKA big squid star)

*Refraktometr* (A.KRÜSS Optronic GmbH)

*Spektrofotometr Nanodrop* (Thermo scientific)

*Termoblok* (Eppendorf Thermomixer comfort)

*Třepačka s nastavitelnou teplotou* (N-Biotec Shaking inkubátor NB 205)

#### 4.1.4. Modelové organismy

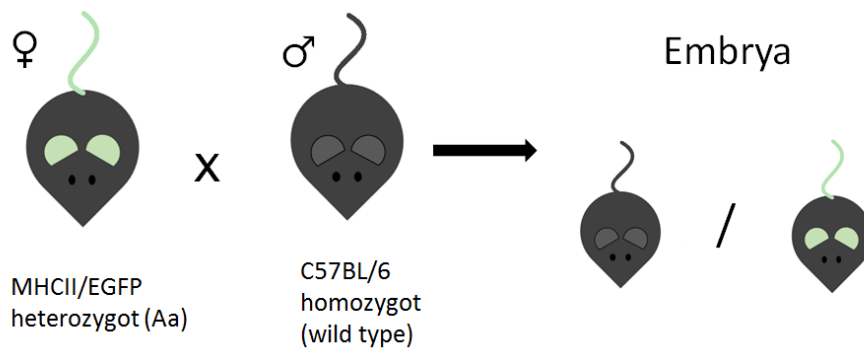
Pro experimenty byly využity inbrední kmeny myší MHCII/EGFP *knock-in* (původ z embryonálních kmenových buněk myšího kmene 129/Sv; H-2<sup>b</sup>) a C57BL/6. Byly umístěny v chovném zařízení na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za standardních podmínek (22 °C, 55% relativní vlhkost) a byla jim podávána ST1 diet (komplexní krmná směs pro myši a potkany v bariérových chovech - Velaz) a voda *ad libitum*.

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Vytvoření myšího modelu pro výzkum maternálního mikrochimérismu

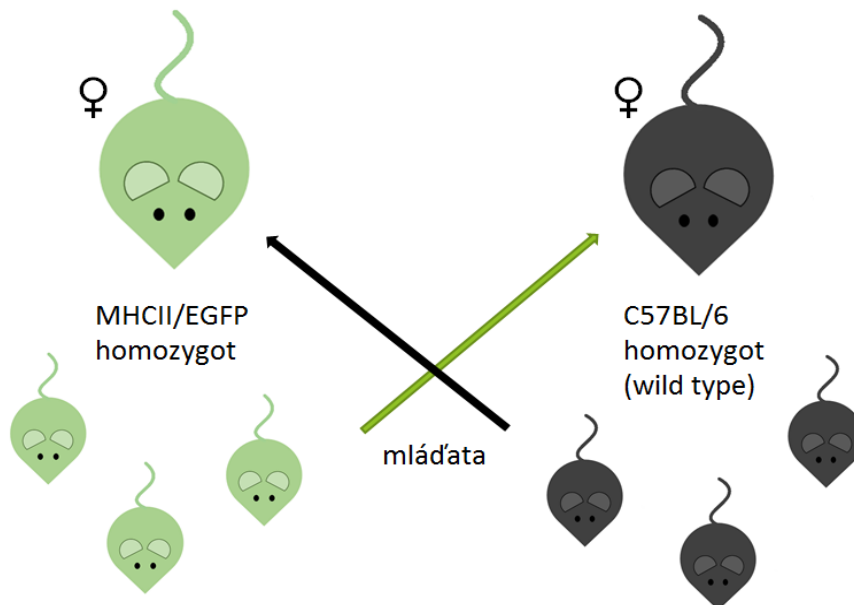
Model pro fetální mikrochimerické experimenty byl vytvořen následujícím postupem: křížením obou kmenů byly nejdříve připraveny heterozygotní samice a ty byly dále kříženy

se samci C57BL/6 (viz obr. 8). Tak vznikla embrya dvou typů (homozygot C57BL/6 a heterozygot MHCII/EGFP). Embrya byla odebírána ve stádiu E13.



**Obr. 8** Křížení pro experimenty zkoumající mikrochimérismus vznikající během těhotenství. Samice MHCII/EGFP heterozygot byla křížena se samce C57BL/6 (homozygot). Tak byla vytvořena embrya dvou typů (MHCII/EGFP heterozygot a C57BL/6 homozygot). Embrya byla odebírána ve stádiu E13.

Pro experimenty zabývající se mikrochimérismem vznikajícím během kojení byla mláďata těsně po porodu vyměněna a kojena u matky odlišného kmene (viz obr. 9). Porod obou samic byl načasován na stejný den. Mláďata byla odebírána postupně 1., 3., 5. a 7. den kojení.



**Obr. 9** Model pro studium mikrochimérismu vznikajícího během kojení. Mláďata byla těsně po porodu odebrána a přemístěna k samici opačného kmene na kojení

## 4.2.2. Genotypizace

### 4.2.2.1. Izolace DNA

Z embryí, resp. z kontrolních dospělých myší, byl odebrán kousek ocasu (o délce maximálně 0,5 cm) a umístěn do 0,5 ml zkumavek Eppendorf. K němu bylo přidáno 75  $\mu$ l 25mM NaOH s 0,2mM EDTA. Směs ve zkumavce byla umístěna na 1 hodinu do termobloku (98 °C, 600 rpm). Po uplynutí času byla teplota snížena na 15 °C a bylo přidáno 75  $\mu$ l 40mM Tris-HCl. Okamžitě následovala centrifugace (3 minuty při 4 000 rpm). Takto připravená DNA byla skladována při -20 °C do druhého dne nebo ihned použita pro PCR.<sup>113</sup>

Při využití komerčního lyzačního roztoku pro izolaci DNA (Viagen) se protokol lišil. Kousek ocasu byl umístěn do 1,5ml zkumavky Eppendorf. K němu bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního roztoku a proteináza K ve finální koncentraci 1 mg/ml. Zkumavka byla umístěna do termobloku na 5 až 6 hodin (55 °C, 600 rpm) nebo do doby, kdy se tkáň zcela rozpustila. Následně byla teplota zvýšena na 85 °C po dobu 45 min. Vzniklý lyzát byl skladován při teplotě -20 °C. Před použitím v PCR reakci byla DNA ředěna vodou (5x).

### 4.2.2.2. PCR

Celá reakce probíhala v objemu 25  $\mu$ l. Mastermix (obsahující dNTPs, primery, buffer, MgCl<sub>2</sub>, polymerázy a H<sub>2</sub>O – viz tabulka 7) byl rozdělen po 24  $\mu$ l do 0,5  $\mu$ l zkumavek a do každé byl přidán 1  $\mu$ l DNA. Zkumavky byly umístěny do cykleru. Jednotlivé cykly PCR byly nastaveny podle tabulky 8 resp. 9.

*Tabulka 7: Reaktanty PCR reakce*

Reakční komponenty	Objem [μl]
10mM dNTPs	0,5
25mM forward primer	1
25mM reverse primer	1
10x PCR buffer (-Mg <sup>2+</sup> )	2,5
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5
LA DNA Polymeráza mix	0,2
Voda	17,3
DNA	1
<b>Celkový objem reakce</b>	<b>25</b>

*Tabulka 8: Nastavení cyklu při použití MHCII/EGFP primerů. Pro kroky 2-4 nastaven počet cyklů na 35.*

Krok	Teplota [°C]	Čas
1	94	5 min
2	94	30 sec
3	58	45 sec
4	72	1 min 10 sec
5	72	5 min
6	4	∞



*Tabulka 9: Nastavení cyklu při použití EGFP primerů. Kroky 2-4 opakovány ve 35 cyklech.*

Krok	Teplota [°C]	Čas
1	95	5 min
2	95	30 sec
3	62,5	1 min
4	72	2 min
5	72	10 min
6	4	∞

Specifické sekvence MHCII/EGFP primerů (5'→3'):

MHCII EGFP forward	TCCTCCAGCAGGACTCCTGCAG
MHCII EGFP reverse	CCCGGCGGCGGTCACGAACTCC
WT forward	TTCAGAGTAAGGTATGGTCAGGGCATT
WT reverse	TTTGGGGTACACTGTGGGGAGGT

Specifické sekvence EGFP primerů:

eGFP reverse	ATGTGGTCGGGGTAGCGCCT
eGFP forward	TCGAGCTGGACGGCGACGTA

#### **4.2.2.3. Agarózová elektroforéza**

Byl připraven 1% (při použití MHCII/EGFP primerů s genovým produktem o velikosti 500 bp a 700 bp) resp. 2,5% (při použití EGFP primerů s menším genovým produktem - 200 bp) agarózový gel v TBE. Do něj bylo přimícháno fluorescenční barvivo GelRed (ředěno 15 000x) pro značení nukleových kyselin. Do první jamky ztuhlého gelu byl nanesen DNA ladder/hmotnostní standard (obsahující různě dlouhé molekuly DNA, které tvoří referenční proužky pro určení velikosti fragmentů zkoumané DNA). Produkty PCR reakce byly smíchány s 8x ředěným BMF a naneseny do dalších jamek gelu. Gel byl zalit TBE a

PCR produkty se nechaly separovat při 70 V přibližně 2 hodiny. Výsledný gel byl focen na DNA transluminátoru pomocí kamery DMK 41AU02 (The Imaging Source).

### 4.2.3. Mikroskopie

#### 4.2.3.1. Příprava histologických řezů

Po odebrání zvolených orgánů byly příslušné tkáně fixovány 24 hodin ve 3,8% formaldehydu při teplotě 4 °C. Poté byly vzorky převedeny do 30% roztoku sacharózy v PBS, ve kterém byly ponechány několik hodin v závislosti na velikosti vzorku (nasycený vzorek tkáně klesne ke dnu) při teplotě 4 °C. Následně byly vzorky zality zamrazovacím médiem Cryomount (během zalévání byly položeny na suchém ledu) a umístěny do -80 °C. S využitím kryostatu Leica CM 3050 (-22 °C) byly zmrazené vzorky nařezány na 10µm tlusté řezy. Ty byly následně přeneseny na podložní sklíčka určená pro kryorezy Superfrost plus.

#### 4.2.3.2. Značení řezů fluorescenčními protilátkami

Připravené řezy (10µm) byly umístěny do barvicí nádoby a ihned zality PBS, aby se zamezilo jejich vysychání. Tkáň byla permeabilizována pomocí 0,5% roztoku Triton X-100 v PBS po dobu nepřekračující 2 min. Následně byly řezy několikrát (3x) promyty PBS a blokovány 10 minut pomocí 1% BSA v PBS. Řezy byly značeny primární protilátkou (anti CD45, anti F4/80), která byla naředěna v 1% roztoku BSA v PBS a byly inkubovány (1 hodinu, RT) ve tmě, zakryté parafilmem tak aby nevysychaly. Následně byly opakovaně (3x) promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou AlexaFluor (594/647) v 1% BSA v PBS (1 hodinu, RT). Nakonec po promytí v PBS (5x) byly řezy zality uzavíracím médiem Fluoroshield obsahujícím DAPI a překryty krycím sklíčkem. U sklíček, která byla připravována pro snímání pomocí virtual slide mikroskopie bylo nutné každý jednotlivý řez obkreslit fixou, aby je přístroj mohl automaticky najít a zaregistrovat. Preparáty byly kontrolovány na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell<sup>R</sup> a snímány plně automatizovaným mikroskopem Zeiss Axio Scan Z1.

#### 4.2.3.3. Clearing tkání pro light sheet mikroskopii

Odebraná tkáň byla očištěna a promyta PBS. Vzorky střeva byly promyty zevnitř pomocí injekční stříkačky (2ml) s jehlou se ztupenou špičkou. Všechny tkáně byly fixovány po dobu 24 hodin v 3,8% formaldehydu, při teplotě 4 °C. Poté byly přeneseny do prvního projasňovacího roztoku CUBIC 1 (složení viz tabulka 5), ve kterém byly projasňovány po dobu od jednoho dne do maximálně jednoho týdne, podle velikosti tkáně a rychlosti zprůhlednění. Následovalo promytí roztokem WASH (1 hod, složení viz tabulka 7) a přenesení do druhého clearovacího roztoku CUBIC 2 (složení viz tabulka 6). Po dobu projasňování byly vzorky vždy zabalené do alobalu a umístěny ve vyhřívané třepačce (37 °C, 120 rpm). Projasněné vzorky byly snímány pomocí light sheet mikroskopu (Zeiss Lightsheet Z.1) s využitím laseru 488 nm a 561 nm. Laser 561 nm byl zařazen ve snaze odlišit nespecifickou fluorescenci na pozadí.

#### 4.2.3.4. Vytváření neuronové sítě při analýze dat z light sheet mikroskopie

Pro tuto část práce jsem navázala spolupráci s Bc. Lenkou Backovou (studentkou magisterského programu bioinformatiky na PŘF UK) a analýzu jsme vypracovávali na pracovištích Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. (oddělení servisní laboratoře zobrazovacích metod) a Biocev (servisní laboratoř světelné mikroskopie). U získaných mikroskopických dat bylo nejdříve nutné provést dekonvoluci v programu Huygens (verze 19.10; Scientific Volume Imaging). Při dekonvoluci bylo provedeno odečtení pozadí (byla provedena s parametrem signal-to-noise ratio s hodnotou 5). Dekonvolucí jsme dosáhli odstranění šumu a malého zlepšení kontrastu. Poté se přistoupilo k segmentaci. Bylo potřeba náhodně vybrat několik rovin v celém objemu vzorku a ručně označit MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky. V programu NIS-Elements (verze 5.21.00; Nikon) jsme na vybraných rovinách vytvořili pomocí manuální segmentace binární masku buněk. Následně jsme nasegmentovanou množinu použili na trénování neuronové sítě v programu NIS-Elements v modulu NIS.ai. Účelem neuronové sítě byla predikce binární masky buněk z obou kanálů (488 nm a 561 nm) dekonvolvaného obrázku. Trénování probíhalo po

dobu 500–1000 iterací na počítači s grafickou kartou NVIDIA Quadro RTX 5000, 126 GB RAM a 8 jádrovým procesorem Intel Xeon W-2145. Trénování 500 iterací trvalo 3–4 hodiny. První neuronovou síť jsme použili na segmentaci dekonvolvovaných dat a z nich jsme vybrali další trénovací roviny, které jsme po kontrole a manuální úpravě masky, použili pro natrénování dalšího prediktoru. Tímto způsobem jsme natrénovali několik samostatných sítí (trénovaných na datech z různých vzorků střeva kojených mláďat). Výsledné natrénované síť jsme použili na predikci binárních masek u zbytku datasetu. Binární maska se upravila odebráním všech objektů menších než 6 pixelů. Na každý dataset jsme použili dvě natrénované síť, jejichž výsledkem byly dvě binární masky buněk. Tyto dvě predikované masky se sjednotily pomocí logické binární operace OR. V dalším kroku se pomocí tresholdu vymezila binární maska, která obsahovala celý objem vzorku (v našem případě střevo). Tato maska byla využita pro výběr buněk uvnitř střeva jako průnik masky střeva a masky buněk pomocí logické binární operace AND. Tímto postupem jsme získali binární masku objektů v každé rovině uvnitř studovaného objemu. Dále bylo potřeba propojit objekty mezi jednotlivými rovinami ve 3D pomocí „Connect 3D objects“ v NIS-Elements. Tato operace spojí objekty v binární masce, které spolu sousedí mezi rovinami v ose z. Každému pixelu v binární masce se přiřadí objekt, ke kterému patří. Následně při kontrole správnosti určení buněk mohly být odstraněny 3D objekty, jako jsou například nečistoty nebo bublinky vzniklé při manipulaci s orgánem.

Ze získaných binárních masek lze vypočítat objem vzorku a z binární masky buněk se získá počet objektů ve 3D. Na základě toho bylo možné získat objemovou hustotu buněk  $n_V$ :

$$n_V = \frac{N}{V}$$

kde N je počet objektů (buněk) a V objem vzorku.

#### 4.2.4. Průtoková cytometrie

##### 4.2.4.1. Příprava buněk pro průtokovou cytometrii

- Slezina

Odebraná tkáň byla mechanicky disociována pomocí pístu z injekční stříkačky v PBS a přefiltrována přes sítko (40 $\mu$ m). Vzniklá buněčná suspenze byla stočena centrifugací (5 minut, při 1400 rpm), vzniklá peleta byla resuspendována v 20 ml PBS. Do 1,5ml zkumavek Eppendorf bylo rozpipetováno 200  $\mu$ l suspenze. Ta byla znovu centrifugována 5 minut při 1400 rpm, byl odlit supernatant a zkumavky byly umístěny na led.

- Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky

K 10  $\mu$ l připravené buněčné suspenze sleziny MHCII/EGFP bylo přidáno 10  $\mu$ l trypanové modři pro odlišení mrtvých buněk. Takto připravený vzorek byl napipetován do Bürkerovy počítací komůrky. Byl spočítán počet buněk v 10 náhodných malých čtvercích a byl vypočítán průměrný počet buněk. Nakonec bylo nutné přepočítat průměrný počet buněk na 1 ml vzorku (P), což bylo provedeno pomocí následujícího přepočtu:

$$P = \frac{N \cdot D \cdot 1000}{H \cdot S}$$

kde N je celkový počet buněk, D je hodnota ředění suspenze trypanovou modří, H je objem jednoho čtverce, ve kterých jsou počítány buňky a S je celkový počet čtverců, ve kterých byl počítán počet buněk. V buněčné suspenzi sleziny byl určen počet buněk na 1 ml v řádu 10<sup>6</sup>. Následně byla vytvořena jednoduchá ředící řada, kdy byla suspenze buněk sleziny MHCII/EGFP přidávána do suspenze buněk sleziny C57BL/6 myši. Tak byly vytvořeny vzorky s obsahem MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v počtu přibližně 10<sup>6</sup> (kontrolní vzorek MHCII/EGFP sleziny), 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> a 10<sup>1</sup>.

- Embrya

Embrya byla odebrána, vyjmuta z obalů a zbavena placenty. Ze všech embryí byl odebrán ocas pro genotypizaci a skladován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Každé embryo bylo v PBS zvlášť nastříháno na co nejmenší části a přemístěno do 1,5ml zkumavek Eppendorf. Do nich byl přidán 1 ml dispázy (1mg/ml) v HBSS bez  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  a zkumavky byly umístěny do temperovaného bloku ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 minut, 600 rpm). Poté byly vzorky promíchány pomocí pipety a znovu umístěny na 5 minut do termobloku. Následně byly vzorky znovu promíchány pomocí protahování špičkou, promyty v roztoku 2% FCS v HBSS s 10mM HEPES a 2mM EDTA a přefiltrovány přes sítko ( $40\mu\text{m}$ ). Buněčná suspence byla centrifugována (8 minut, 1650 rpm) a po odlití supernatantu doplněna na objem 200  $\mu\text{l}$ . Do 96 jamkové destičky byl tento objem rozdělen na 50  $\mu\text{l}$  (pro vzorky sloužící jako neznačená kontrola, k níž byl přidán pouze Hoechst 33258) a 150  $\mu\text{l}$  (pro značené vzorky). Napipetované vzorky byly centrifugovány (8 min, 1650 rpm) a destička s peletami byla umístěna na led.

#### 4.2.4.2. Značení fluorescenčními protilátkami

Buňky byly značené protilátkami, které byly naředěny v roztoku PBS s 0,02% želatinou a 0,01% azidem sodným na optimalizované koncentrace viz tabulka 4 (barvení 30 minut ve tmě, na ledu). Poté byly vzorky opakovaně (2x) promyty PBS s 0,02% želatinou a 0,01% azidem sodným a centrifugovány (3 min, 1400 rpm). Nakonec byl přidán Hoechst 33258 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) k odlišení mrtvých buněk. Stejným způsobem byly připraveny také FMO kontroly. K měření byl využit průtokový cytometr BD LSR II. Data byla následně vyhodnocována pomocí softwaru FlowJo (verze 10.5.3; BD Bioscience).

## 5. Výsledky

Experimenty pro detekci maternálního mikrochimérismu v těle potomka s využitím MHCII/EGFP myšního modelu byly rozděleny do dvou částí. V první části byly zahrnuty experimenty zkoumající buňky přecházející mezi matkou a plodem během těhotenství (transplacentárně). Druhá část se zaměřila na studium buněk přenesených z matky do těla potomka mateřským mlékem během kojení.

### 5.1. Detekce embryonálního mikrochimérismu

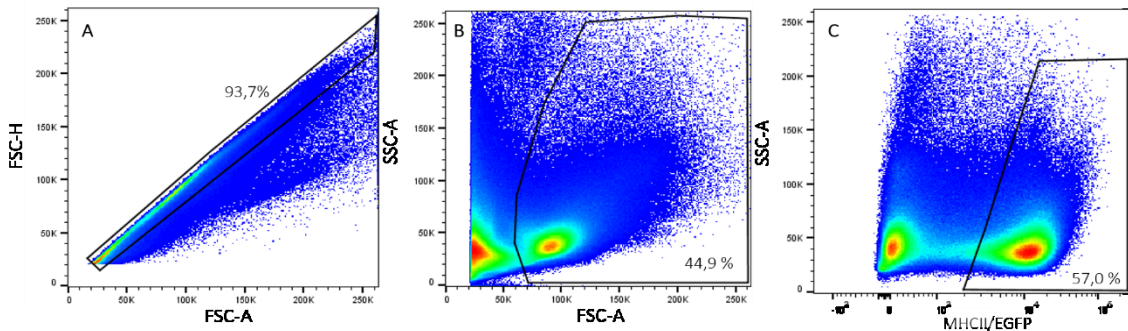
K detekci mateřských mikrochimérních buněk v tkáních embrya jsme využili speciálního křížení (viz obr. 8). Na základě tohoto křížení mohly do embryí přecházet MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky pocházející z těla matky a ty poté bylo možné detekovat v embryích typu C57BL/6. Při hledání MHCII/EGFP pozitivních buněk bylo využito několika různých přístupů včetně průtokové cytometrie a dvou různých mikroskopických metod.

#### 5.1.1. Detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu pomocí průtokové cytometrie

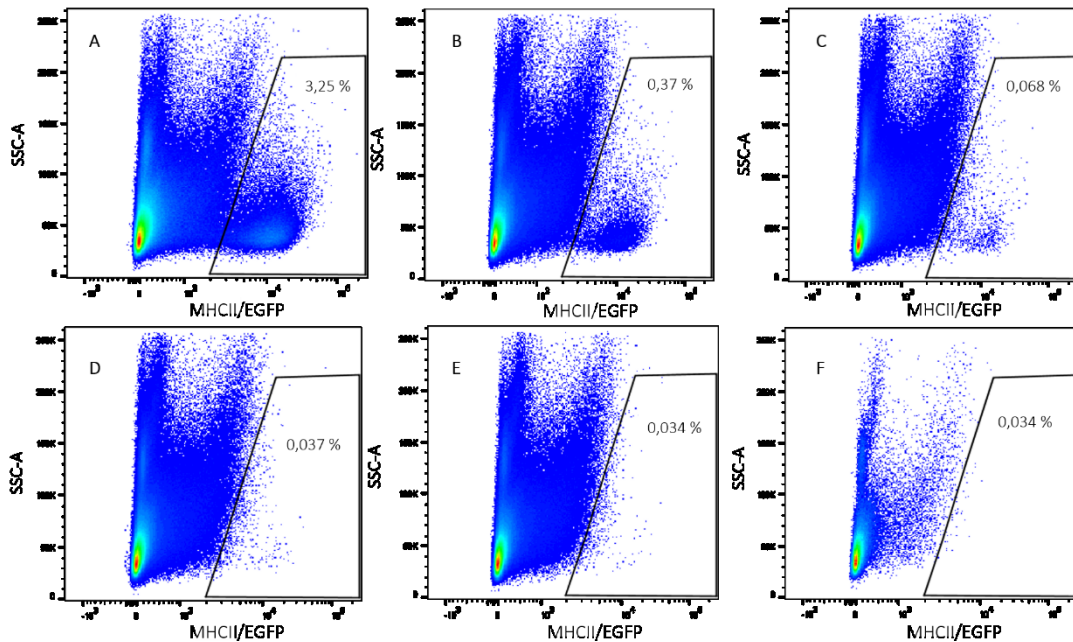
Byly provedeny dva experimenty. V prvním bylo získáno a zpracováno 8 a ve druhém 7 embryí (stádium E13). K těmto experimentům byly přiřazeny také dvě C57BL/6 a dvě MHCII/EGFP kontroly (stejně stádium).

Protože jsme předem očekávali velmi malé procento MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk detekovatelných v embryu, provedli jsme jednoduchý přípravný experiment, který nám měl pomoci zjistit, jak malé populace MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk je metoda průtokové cytometrie schopna ještě zachytit. Byla připravena koncentrační řada, kdy se k suspenzi buněk ze sleziny C57BL/6 přidávaly buňky ze sleziny MHCII/EGFP myši o přibližné koncentraci od  $10^5$  po  $10^1$ . Následně jsme se pomocí průtokové cytometrie snažili detekovat MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky mezi buňkami sleziny dospělé C57BL/6 myši. Obr. 10 zobrazuje gateovací strategii využitou pro tento experiment. Na obr. 11 jsou vedle sebe

seřazeny výsledné dotploty pro jednotlivé koncentrace od  $10^5$  (A) až po negativní kontrolu (slezinu C57BL/6 myši).



**Obr. 10.** Ukázka použité gateovací strategie buněk získaných ze sleziny dospělé MHCII/EGFP knock-in myši. (A) Nejdříve byla oddělena populace singletů. (B) Pomocí SSC-A a FSC-A byla vybrána populace buněk. (C) Na obrázku je znázorněno procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk.



**Obr. 11** Ředící řada vytvořená pro určení rozlišovací schopnosti metody průtokové cytometrie detekovat MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky ze sleziny dospělé myši mezi splenocyty získanými z C57BL/6 myši. (A-E) Buněčné suspenze s vypočítaným přibližným obsahem MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk postupně od  $10^5$  po  $10^1$ . (F) Znáznorněna kontrola C57BL/6 (negativní kontrola).

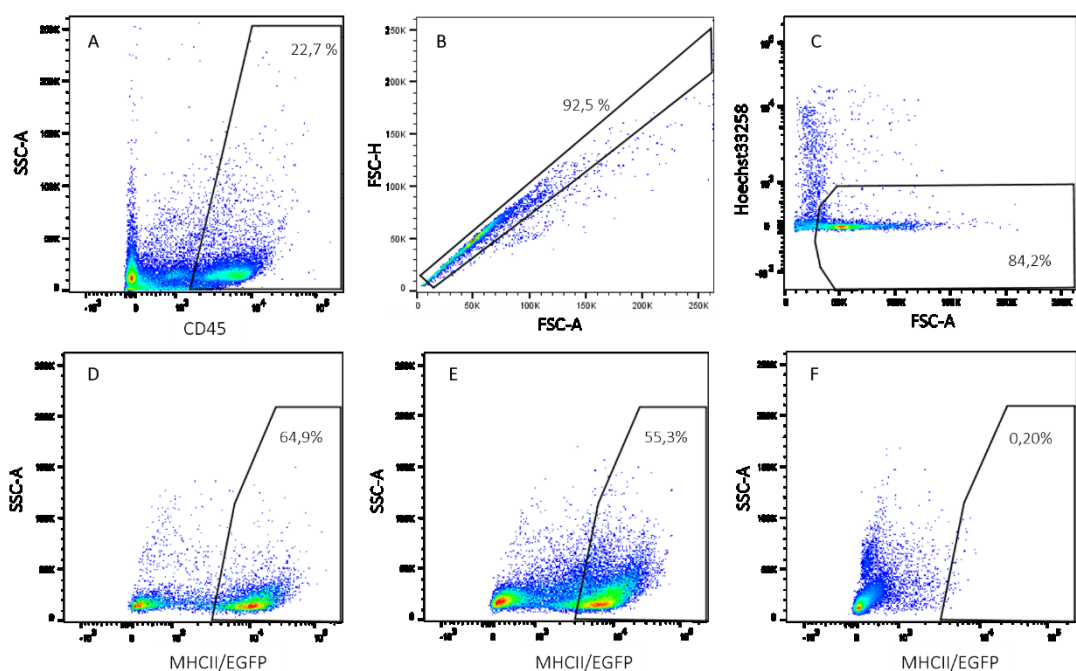
Pomocí tohoto experimentu jsme byli bezpečně schopni detekovat MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky až do řádu  $10^3$  (viz tabulka 10).



**Tabulka 10** Výsledné počty MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk nalezených ve vzorcích sleziny dospělé myši získaných z ředící řady. Obsah buněk ve vzorcích byl předem vypočítán a nabýval hodnot od 10<sup>5</sup> po 10<sup>1</sup>.

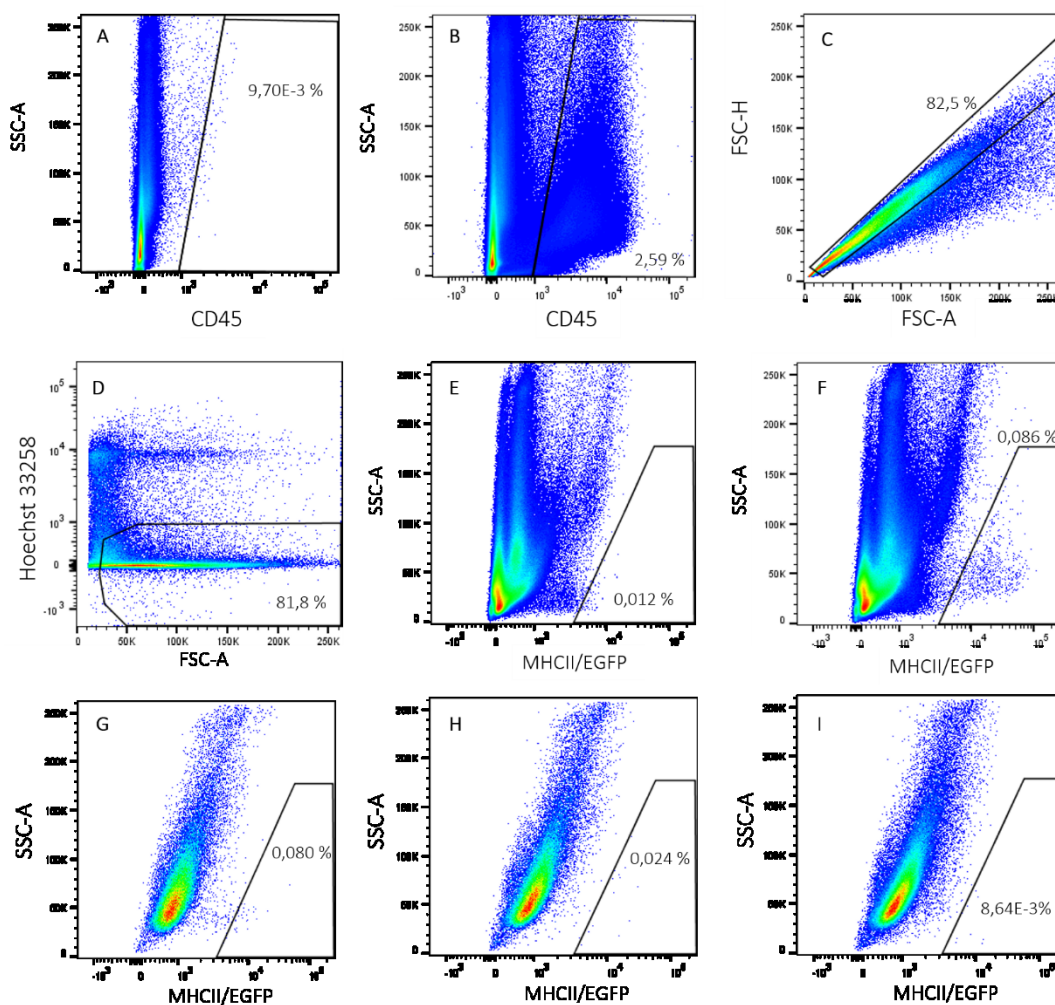
Vzorek sleziny	Celkový počet změřených buněk	Počet detekovaných MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk/buňky	Frekvence [%] MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk/buňky
C57BL/6	106 604	36	0,034
MHCII/EGFP	993 000	566 000	57
10 <sup>5</sup>	1 070 000	34 673	3,25
10 <sup>4</sup>	1 960 000	7197	0,37
10 <sup>3</sup>	2 100 000	1428	0,068
10 <sup>2</sup>	1 960 000	733	0,037
10 <sup>1</sup>	1 880 000	638	0,034

Poté jsem přistoupila k samotným experimentům, které byly nejdříve pro kontrolu provedeny na slezině dospělých myši (C57BL/6, MHCII/EGFP a MHCII/EGFP heterozygota). Pro lepší charakterizaci buněk byla nejdříve použita protilátka proti CD45 (marker buněk odvozených od hematopoetických prekurzorů). Z populace CD45<sup>+</sup> buněk byla oddělena populace singletů od doubletů a větších shluků buněk. Dále byly na základě barvení Hoechst 33258 odděleny mrtvé buňky a z živých buněk byla oddělena populace MHCII/EGFP pozitivních buněk. Zde je ukázána použitá gateovací strategie na slezině MHCII/EGFP *knock-in* myši a porovnání procentuálního zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk ve vzorcích sleziny z dospělé *knock-in* myši MHCII/EGFP, heterozygota a C57BL/6 (viz obr. 12).



**Obr. 12** Gateovací strategie použitá u buněk sleziny dospělé myši. Značeno CD45, MHCII. (A) Nejdříve byla oddělena populace CD45<sup>+</sup>buněk. (B) Oddělení singletů. (C) Oddělení živých buněk podle intenzity fluorescence v kanálu pro Hoechst 33258. (D-F) porovnání procentuální zastoupení EGFP pozitivních buněk ve vzorcích sleziny. (D) MHCII/EGFP homozygot, (E) MHCII/EGFP heterozygot, (F) C57BL/6 homozygot.

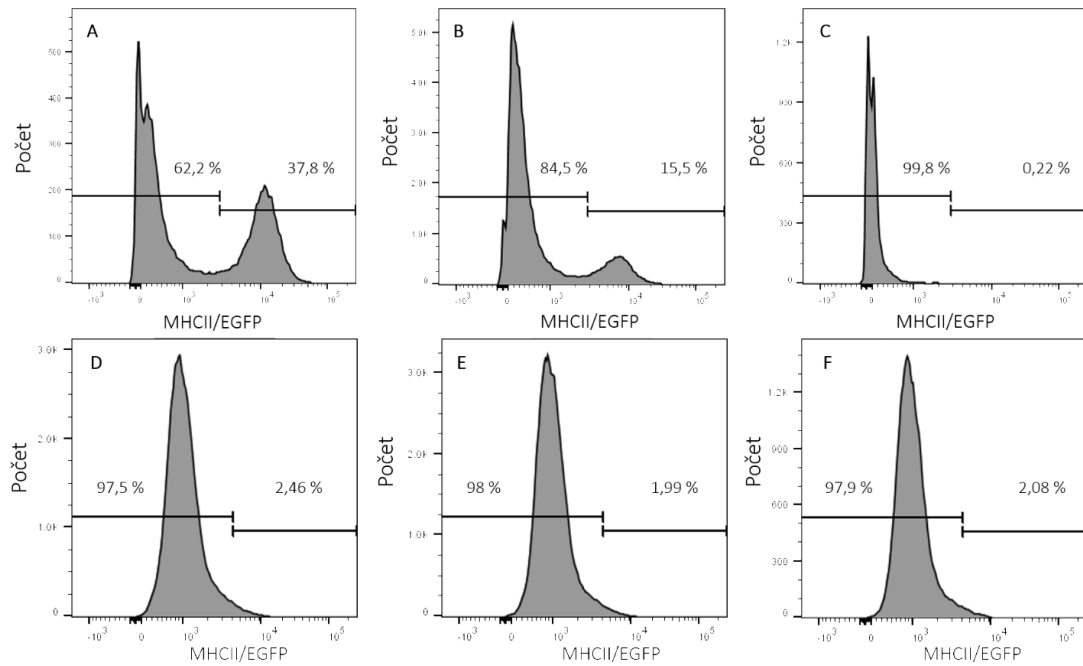
Stejná gateovací strategie byla využita i při analýze vzorků embryí. Na základě této gateovací strategie jsme nemohli u embryí s jistotou odlišit typ MHCII/EGFP heterozygot a C57BL/6 (viz obr. 13).



**Obr. 13** Gateovací strategie buněk získaných z embrya (E13). Značeno CD45 a MHCII. (A) Embryo C57BL/6 (negativní kontrola pro gateování CD45<sup>+</sup> buněk). (B) Oddělení populace CD45<sup>+</sup> buněk u embrya MHCII/EGFP. (C) Oddělení populace singletů u embrya MHCII/EGFP. (D) Na základě barvení Hoechst 33258 byly odděleny živé buňky. (E) Procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu C57BL/6 (negativní kontrola). (F) Procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu MHCII/EGFP. (G) Procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu později označeném jako MHCII/EGFP heterozygot. (H) Procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu později označeném jako C57BL/6. (I) Procentuální zastoupení MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu později označeném jako C57/BL6.

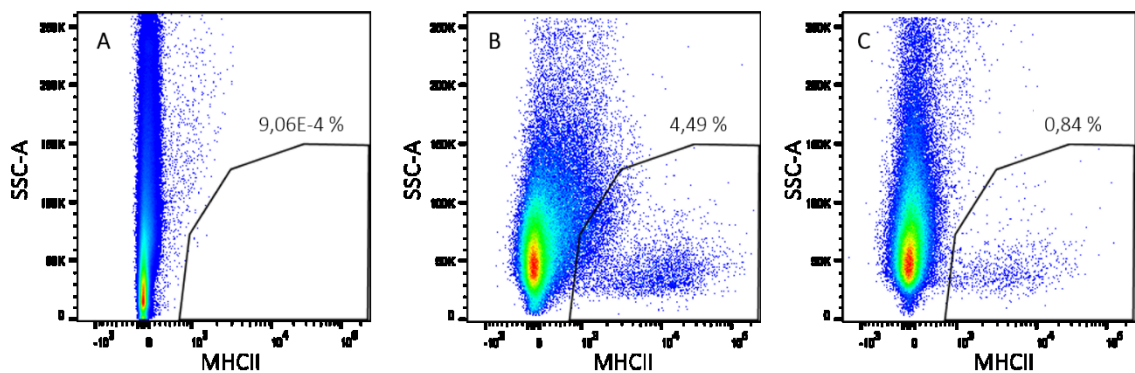
Aby bylo možné detekovat MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky v embryích C57BL/6, bylo potřeba během analýzy oba typy embryí od sebe odlišit. Původně jsme je chtěli odlišit na základě intenzity fluorescence, ale na rozdíl od sleziny dospělé myši u embryí nebylo možné tuto

metodu využít nejspíše z důvodu nízké exprese MHCII/EGFP u embrya (viz obr. 14).

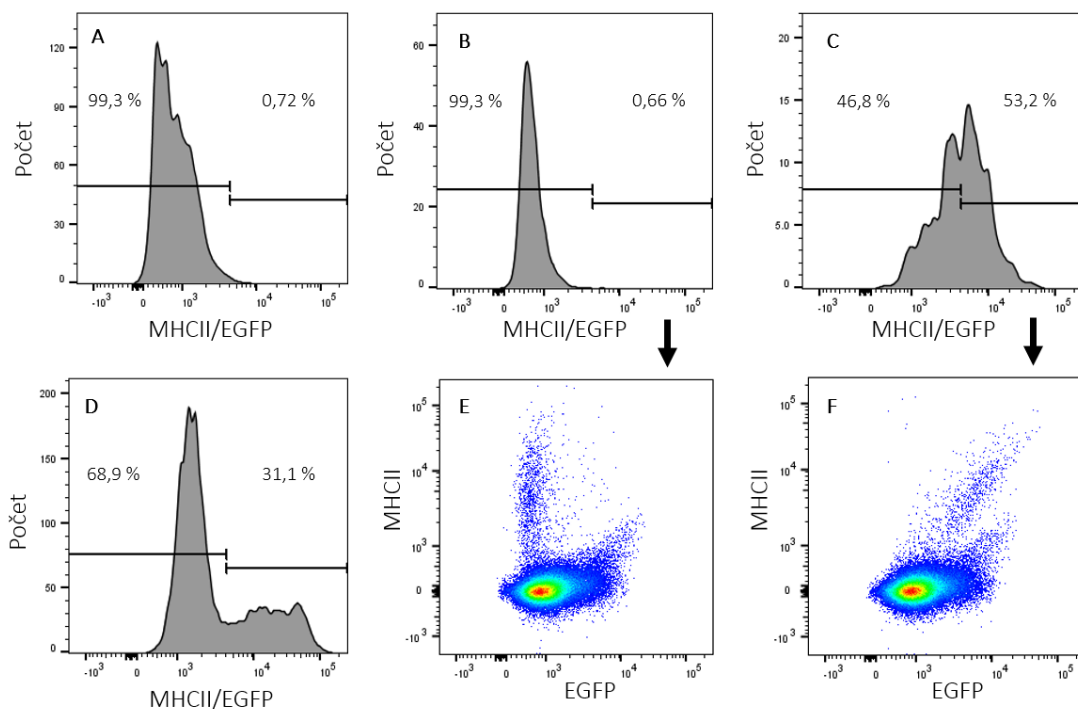


**Obr. 14.** Intenzita fluorescence MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk u vzorků ze sleziny dospělé myši a embryí (E13). (A) Splenyocyty získané z MHCII/EGFP knock-in myši, (B) splenyocyty z MHCII/EGFP heterozygota, (C) splenyocyty z C57BL/6 myši. (D) Embryo později označené jako MHCII/EGFP heterozygot, (E) embryo později označené jako C57BL/6, (F) embryo později označené jako MHCII/EGFP heterozygot.

Proto jsme u embryí nejdříve zagateovaly MHCII<sup>+</sup> buňky značené protilátkou (viz obr. 15) a až na nich jsme použili odlišení podle intenzity fluorescence (viz obr. 16).



**Obr. 15** Ukázka gateování MHCII<sup>+</sup> populace buněk u vzorků embrya (E13). (A) Embryo C57BL/6 (negativní kontrola). (B) Embryo MHCII/EGFP knock-in myši. (C) Embryo později na základě intenzity fluorescence označené jako heterozygot.



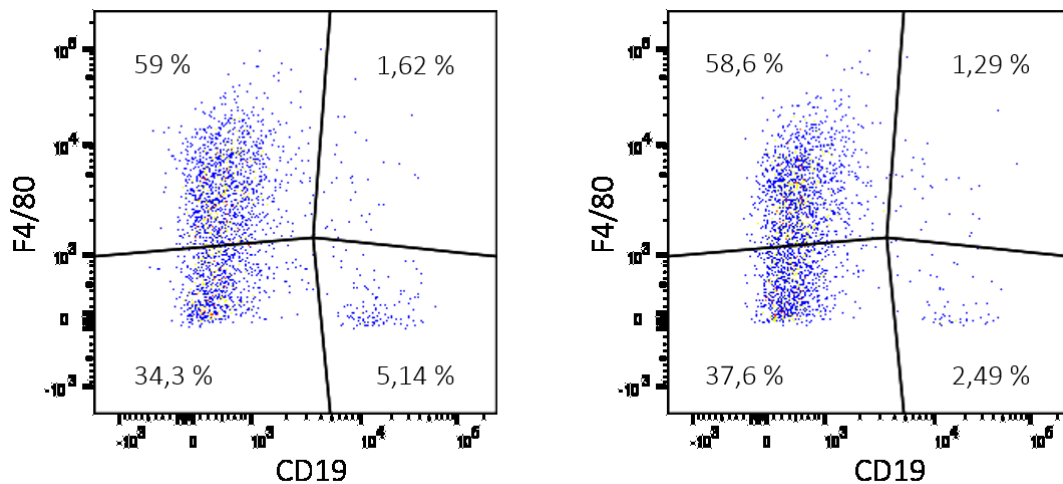
**Obr. 16.** Ukázka možnosti odlišení typu embryí MHCII/EGFP heterozygot a C57BL/6 (E13) na základě intenzity fluorescence MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk. Gateováno z MHCII<sup>+</sup> buněk. (A) Embryo C57BL/6 - kontrola, (D) embryo MHCII/EGFP – kontrola, (B) embryo označené na základě histogramu jako C57BL/6, (C) embryo označené na základě histogramu jako MHCII/EGFP heterozygot (během použitého křížení – viz obr. 8 nemůže vznikat embryo typu MHCII/EGFP homozygot). (F) Výskyt MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu MHCII/EGFP (značeno protílátkou MHCII). (E) Populace MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk u embryu C57BL6 chybí (značeno protílátkou MHCII).

Na základě provedené analýzy jsme určili, že z celkem 15 embryí ve dvou experimentech bylo 10 MHCII/EGFP heterozygotů a 5 C57BL/6. V embryu C57BL/6 byly naměřeny hodnoty MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk blízkých hodnotám naměřených u C57BL/6 kontroly. Například u E14, označeného podle intenzity fluorescence MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk jako C57BL/6 embryo, bylo detekováno 13 (0,024 %) MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk. Ve srovnání kontrolní C57BL/6 embryo obsahovalo 13 (0,016 %) MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk (podrobněji viz tabulka 11). Specifická přítomnost buněk MHCII/EGFP v embryích C57BL/6 tedy nebyla prokázána.

**Tabulka 11** Frekvence a počty MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk změřených v embryích C57BL/6, MHCII/EGFP resp. heterozygotů. Tabulka obsahuje výsledky ze dvou experimentů. Červeně ohraničená část tabulky označuje embrya (E) z prvního experimentu, modrá část ohraničuje druhý experiment. Šedou barvou jsou zvýrazněná embrya, která jsme na základě výsledků z průtokové cytometrie označili jako C57BL/6. V prvních čtyřech řádcích jsou zapsány výsledky pro C57BL/6 a MHCII/EGFP kontroly.

Vzorek	Frekvence [%] MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk	Počet MHCII/EGFP <sup>+</sup> buněk	Celkový počet živých buněk
C57BL/6 1	6,59.10 <sup>-3</sup>	7	106 285
C57BL/6 2	0,016	13	81 729
MHCII/EGFP 1	2,06	2 272	110 282
MHCII/EGFP 2	1,73	2 326	134 128
E1	0,18	165	90 285
E2	0,28	253	88 833
E3	0,28	318	113 253
E4	0,11	46	42 083
E5	0,33	377	115 258
E6	0,027	31	115 882
E7	0,35	373	107 060
E8	0,12	115	98 123
E9	0,13	60	45 818
E10	0,24	142	58 287
E11	0,080	34	42 242
E12	0,19	123	64 779
E13	0,27	260	96 823
E14	0,024	13	53 259
E15	8,66.10 <sup>-3</sup>	9	103 941

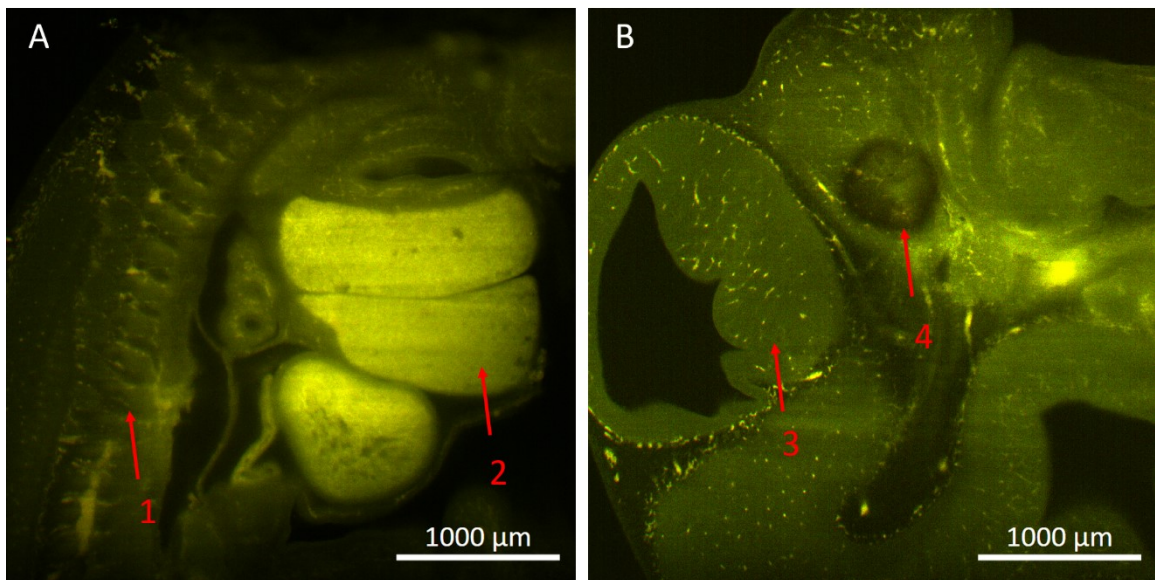
Pro bližší fenotypizaci byly dále využity protilátky F4/80 a CD19, aby bylo možné odlišit konkrétní populace buněk v rámci MHCII/EGFP<sup>+</sup> populace. Protože se nám nepodařilo objevit MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky v embryích C57BL/6, je zde ukázána fenotypizace na dvou embryích MHCII/EGFP heterozygotů (E13). Ze všech MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk embrya MHCII/EGFP heterozygota tvořily makrofágy (F4/80<sup>+</sup> buňky) 59 % a 58,6 % a B lymfocyty (CD19<sup>+</sup> buňky) 5,14 %, resp. 2,49 % (viz obr. 17).



*Obr. 17 Fenotypizace MHCII/EGFP<sup>+</sup> populace buněk u MHCII/EGFP embrya (E13). Značeno protilátkami CD19 a F4/80. Gateováno na populaci MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk*

### 5.1.2. Detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> v embryu pomocí light sheet mikroskopie

První mikroskopickou metodou využitou ve snaze zdokumentovat lokalizaci MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v kontextu embrya byla light sheet mikroskopie. V této části byl proveden jeden experiment, v němž bylo zahrnuto 6 embryí získaných (stejně jako u průtokové cytometrie) specifickým křížením (viz obr. 8). Embrya byla projasněna podle protokolu (viz materiály a metody) a snímána mikroskopem Zeiss Lightsheet Z.1 s využitím objektivu 5x resp. 20x a laseru 488 nm a 561 nm. Abychom mohli určit kam maternální MHCII/EGFP<sup>+</sup> migrují, snímali jsme různé části embryí zahrnující hlavovou část, s vyvíjejícím se okem a mozkiem a břišní dutinu s játry (viz obr. 18).



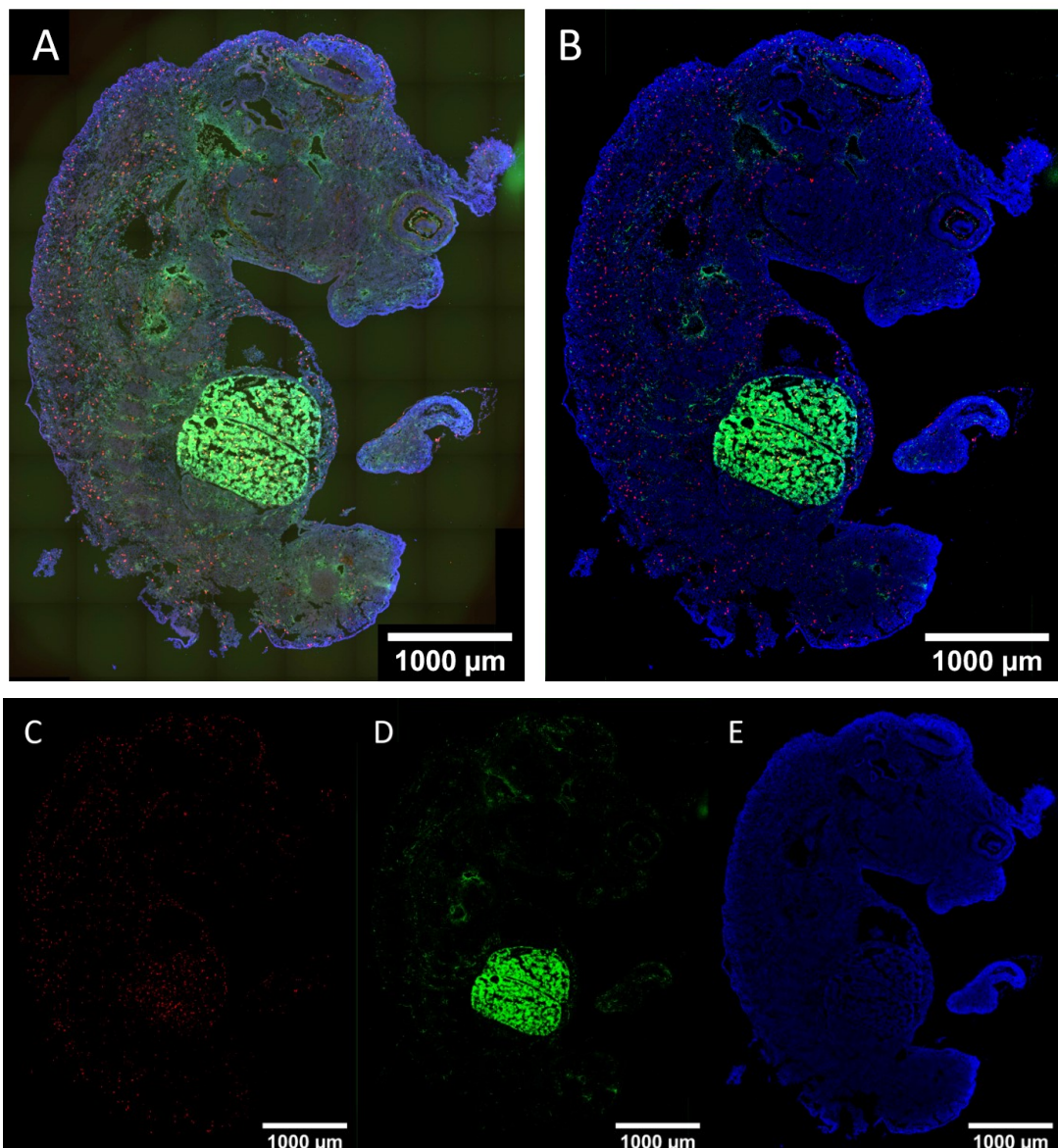
**Obr. 18** Embrya (E13) snímána lightsheet mikroskopem Zeiss Lightsheet Z.1, objektiv 5x. (A) Střední část trupu embrya. 1 - páteř, 2- embryonální játra. (B) Hlavová část embrya. 3 - vyvíjející se mozek, 4 - vyvíjející se oko. U embryí nebyl určen genotyp.

Vzhledem k nedostatečné optimalizaci genotypizace (viz dále kapitola 5.1.4.) jsme nemohli v okamžiku experimentu odlišit embrya C57BL/6 od MHCII/EGFP heterozygotů. Kvůli vysoké míře autofluorescence nebylo možné detekovat MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky v myším embryu pomocí light sheet mikroskopie.



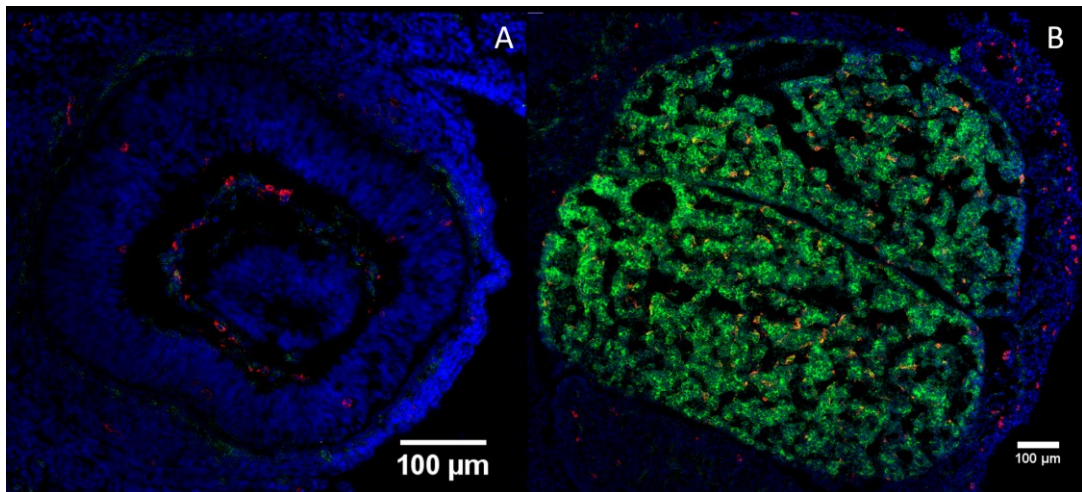
### 5.1.3. Detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu pomocí virtual slide mikroskopie

Druhou využitou mikroskopickou metodou byla virtual slide mikroskopie. V tomto experimentu bylo zařazeno celkem 5 embryí (křížení společné s předchozími metodami – viz obr. 8). Embrya (E13) byla značena protilátkami proti CD45 a F4/80. Jádra byla značena DAPI. Pro lepší výsledek byla použita obrazová dekonvoluce v programu Huygens (viz obr. 19).



**Obr. 19** Embryo (E13) snímané virtual slide mikroskopem Zeiss AxioScan Z1, objektiv 20x. (A) Nasnímaný obrázek před dekonvolucí. (B) Obrázek po dekonvoluci v programu Huygens. (C-E) Rozložení na jednotlivé kanály. (C) Makrofágy značené F4/80 (červený kanál), (D) MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky (zelený kanál) (E) Jádra značená DAPI (modrý kanál).

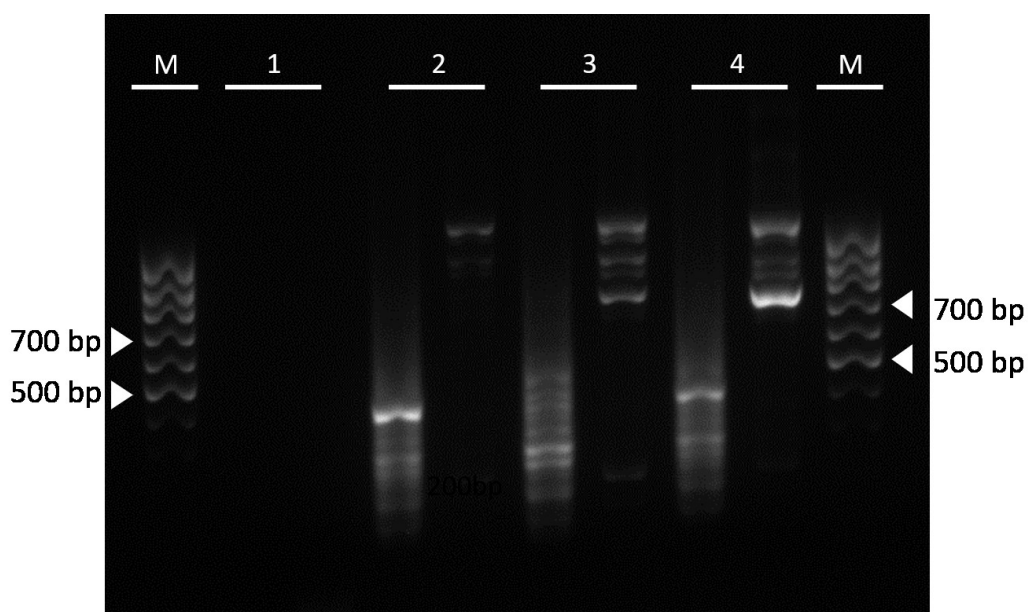
Tato metoda poskytuje obrázky se skvělým rozlišením a možností přiblížení na jednotlivé buňky (viz obr. 20 přiblížení buněk fetálních jater a vyvíjejícího se oka) a má tedy skvělé předpoklady pro detekci mateřských MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk. Bohužel data zatím nebylo možné správně analyzovat, a tedy ani prokázat přítomnost mikrochimerních buněk.



*Obr. 20 Ukázka vysoké kvality rozlišení u obrázků orgánů embryí (E13) snímaných pomocí virtual slide mikroskopie. (A) Vyvíjející se oko embrya. (B) Embryonální játra. Modře značená jádra pomocí DAPI, červené jsou F4/80<sup>+</sup> buňky (makrofágy), zelené jsou MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky.*

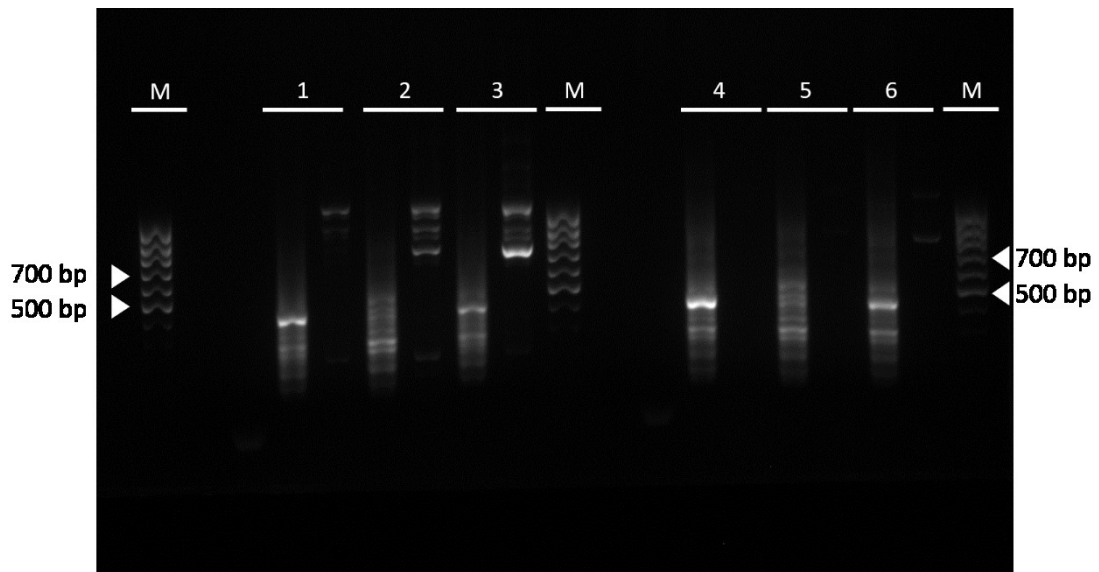
#### 5.1.4. Rozlišení genotypu embryí pomocí PCR

Tato metoda byla využita se záměrem odlišit embrya MHCII/EGFP heterozygotů od C57BL/6 pro průtokovou cytometrii a mikroskopii. Původní použitý protokol obsahoval 2 páry primerů, díky nimž je možné odlišit C57BL/6 (genový produkt o velikosti 500 bp), MHCII/EGFP (genový produkt o velikosti 700 bp) a heterozygota (genové produkty 500 i 700 bp). Na obr. 21 je zobrazen jeden z výsledných gelů, na kterém jsou vidět s viditelnými PCR produkty o velikost 500 bp a 700 bp.



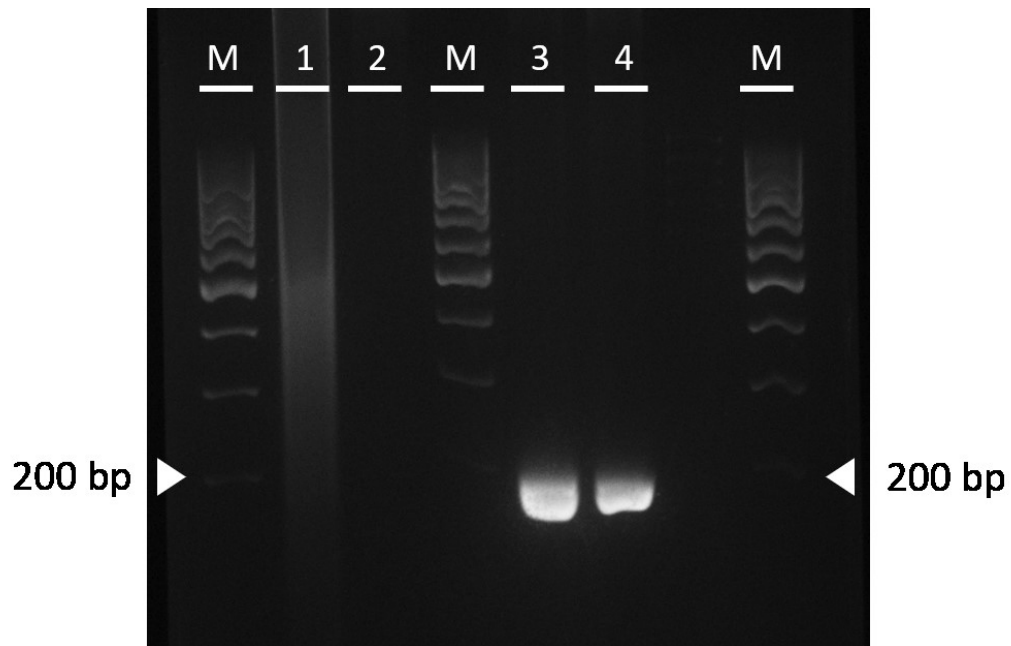
**Obr. 21** Genotypizace myši při využití MHCII/EGFP primerů (sada obsahující dva páry primerů). DNA byla izolována z ocasů dospělých myši (M) Marker (hmotnostní standard). (1) Master mix bez DNA. (2) PCR produkt C57BL/6 myši o velikosti 500 bp. (3) PCR produkt MHCII/EGFP myši o velikosti 700 bp. (4) Heterozygot má oba tyto produkty (500 bp i 700 bp).

Na obr. 22 je zobrazen jeden z gelů získaných během optimalizace metody. Při tomto experimentu byly nastaveny různé počty cyklů PCR reakce (33 resp. 28) a změněno množství přidávaných primerů oproti původnímu protokolu z 1  $\mu$ l na 0,3  $\mu$ l (v celkovém objemu reakce 25  $\mu$ l).



**Obr. 22** Optimalizace genotypizace myší s využitím MHCII/EGFP primerů (sada obsahující dva páry primerů). DNA izolována z ocasů dospělých myší. (M) Marker (hmotnostní standard). (1, 4) PCR produkt C57BL/6 myši o velikosti 500 bp. (2, 5) PCR produkt MHCII/EGFP myši o velikosti 700 bp. (3, 6) PCR produkty MHCII/EGFP heterozygota o velikosti 500 i 700 bp. (1-3) Počet cyklů PCR reakce byl 33, do reakce bylo přidáno 0,3  $\mu$ l primerů. (4-6) Počet cyklů PCR reakce byl 28 a množství přidávaných primerů 0,3  $\mu$ l (celkový objem reakce byl v obou případech 25  $\mu$ l).

Bohužel se nám opakovaně nedařilo dojít ke spolehlivému výsledku experimentu, a proto jsme se rozhodli změnit postup izolace DNA (s využitím komerčního lyzačního roztoku) a použít jiné primery. Rozhodli jsme se pro využití primerů pro EGFP. Jde o sadu pouze jednoho páru primerů schopných odhalit přítomnost EGFP ve vzorku, ale bez schopnosti odlišit specificky MHCII/EGFP heterozygota, což pro naše experimenty nebylo potřeba. Byl proveden první experiment, ve kterém byly genotypizovány vzorky získané z ocasu dospělých myší (viz obr. 23), kterým jsme si ověřili, že tyto primery budou pro naše experimenty vhodné. DNA embryí využitých pro experimenty v této práci je uchována v  $-20^{\circ}\text{C}$  a bude využita pro zpětné určení genotypu pomocí těchto EGFP primerů.



*Obr. 23* Genotypizace myší prostřednictvím EGFP primerů. DNA byla izolována z ocasu dospělých myší. (M) Marker (hmotnostní standard). (1) Mastermix bez DNA. (2) Vzorek C57BL/6 dospělé myši bez genového produktu. (3) Genový produkt MHCII/EGFP myši velký 200 bp. (4) Genový produkt MHCII/EGFP heterozygota o velikosti 200 bp.

## **5.2. Detekce mikrochimérismu indukovaného kojením**

Pro detekci mikrochimérických (MHCII/EGFP<sup>+</sup>) buněk přenesených kojením z matky do těla mláďat byly předem vybrány 3 orgány, které se dále zpracovávaly, a to tenké střevo, tlusté střevo a slepé střevo. Snímány byly dvěma různými mikroskopickými metodami.

### **5.2.1. Detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk ve střevě pomocí light sheet mikroskopie**

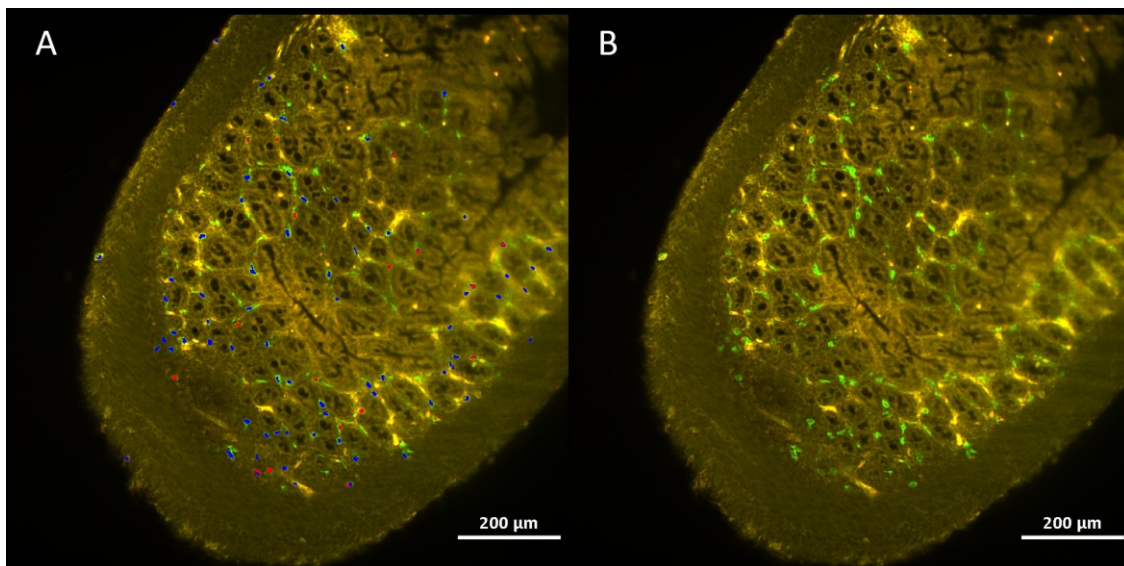
Mláďata C57BL/6 kojená u MHCII/EGFP matky, resp. MHCII/EGFP mláďata kojená u C57BL/6 matky (viz obr. 9) byla usmrcena 1., 3., 5. respektive 7. den od začátku kojení. Byla provedena celkem 3 opakování u každého orgánu a každého dne. Jako kontrola byla připojena mláďata C57BL/6 kojená u stejných matek (C57BL/6).

Metodou neuronové sítě jsme určili počet buněk MHCII/EGFP<sup>+</sup> v tenkém střevě kojených mláďat a tyto výsledky jsme porovnali s počty buněk nalezených stejným způsobem ve střevě kontroly (viz tabulka 12).

**Tabulka 12.** Počet MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk detekovaných neuronovou sítí ve vzorcích tenkého střeva MHCII/EGFP, resp. C57BL/6 mláďat myší kojených. Tmavě zelenou barvou jsou zvýrazněny vzorky získané z MHCII/EGFP mláďat. Světle zelené jsou vzorky C57BL/6 mláďat kojených u MHCII/EGFP samic. Kontrolní vzorky byly získány z C57BL/6 mláďat kojených u C57BL/6 matek (v tabulce nejsou barevně zvýrazněny).

Den kojení	Počet buněk na objem vzorku [mm <sup>3</sup> ]	Objemová hustota buněk [mm <sup>-3</sup> ]
1.	2 139/0,316	6 763
3.	5 046/0,522	5 500
5.	4 472/0,365	12 000
7.	2 529/0,348	7 230
1.	150/0,564	266
3.	474/0,517	916
5.	1 076/0,643	1 674
7.	166/0,357	465
C57BL/6, kontrola (5. den)	153/0,134	1 110
C57BL/6 kontrola (3. den)	79/0,256	308

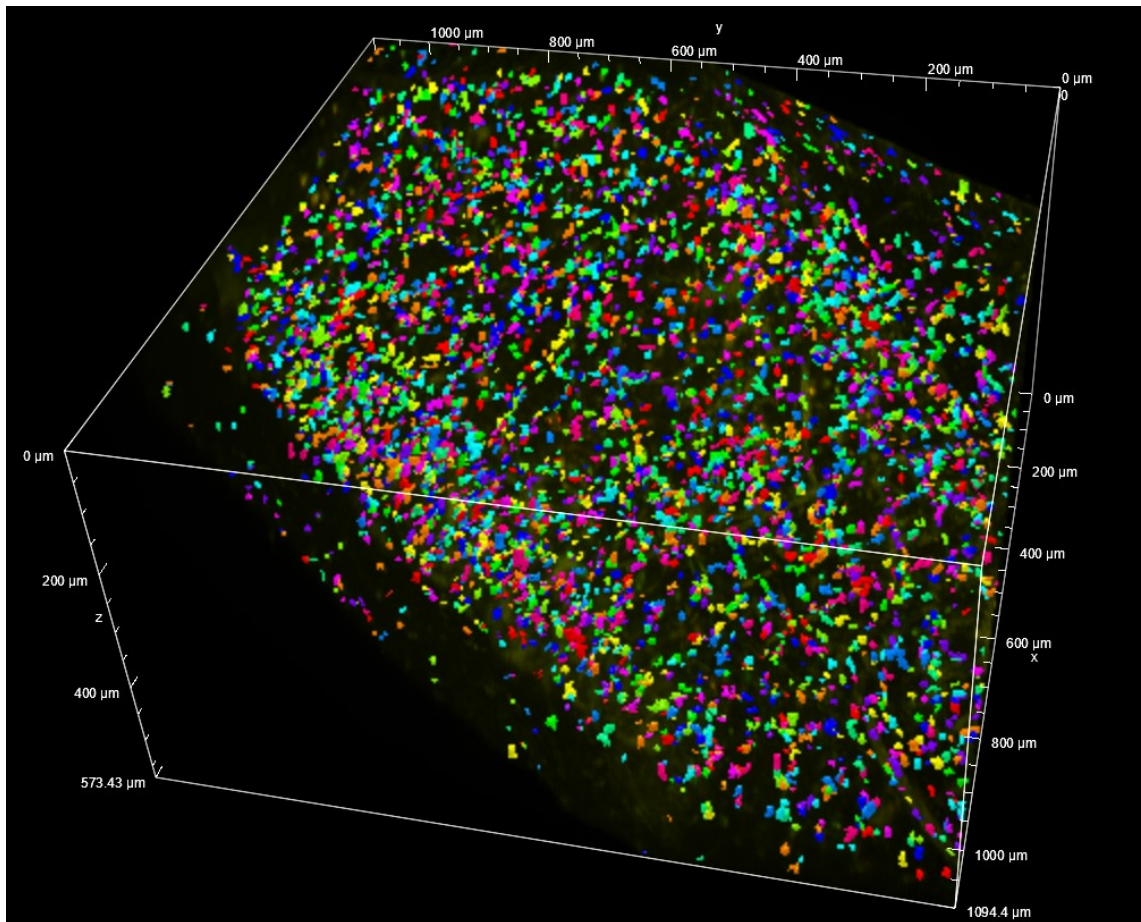
Postupně bylo vytvořeno několik různých neuronových sítí s různou schopností detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk. Pro demonstraci zde uvádím porovnání dvou různých neuronových sítí v tenkém střevě MHCII/EGFP mláďete kojeného 5 dní u samice C57BL/6. První z těchto sítí byla vytvořena na základě příliš malého datasetu (manuálně bylo nasegmentováno přibližně 60 buněk), a proto tato síť byla schopná detekovat pouze malé množství buněk. Pro trénování druhé neuronové sítě bylo manuálně nasegmentováno přibližně dvojnásobné množství buněk a tato síť byla schopná detekovat množství buněk blízké se reálnému stavu (viz obr. 24).



*Obr. 24 Porovnání úspěšnosti dvou různých neuronových sítí při detekci MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v tenkém střevě MHCII/EGFP mláděte z 5.dne kojení. Na obrázku vlevo: červeně zobrazená neuronová síť byla vytvořena jako první a byla schopná započítat pouze malé množství buněk. Modře je zde pro porovnání znázorněna aktuálně nejlépe natrénovaná neuronová síť, která je schopná zachytit velké množství buněk v celém objemu vzorku. Na obrázku vpravo stejná rovina vzorku bez aplikovaných masek.*

Pro zhodnocení distribuce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk ve vzorku tenkého střeva MHCII/EGFP mláděte jsme z jednotlivých řezů, na které byla aplikována maska neuronové sítě, následně sestavili 3D model (viz obr. 25)



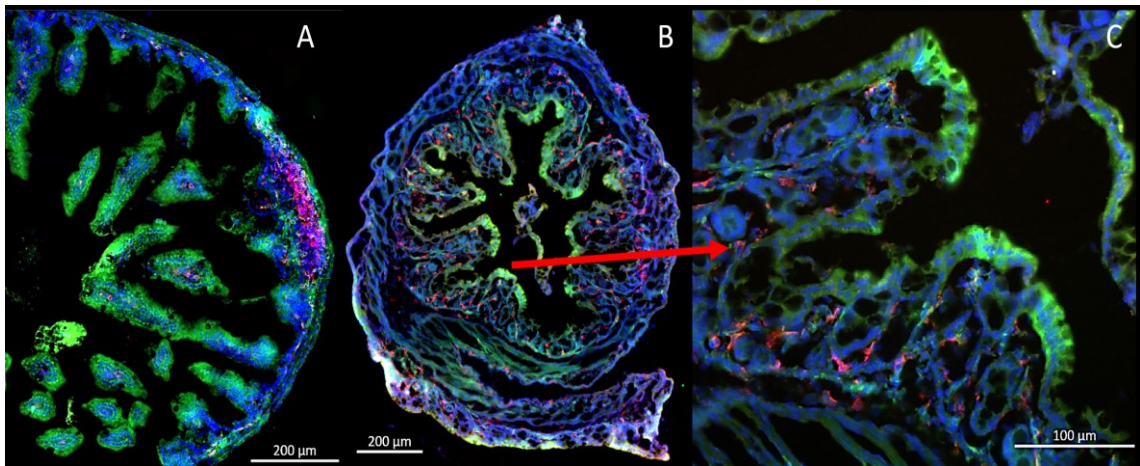


*Obr. 25 3D zobrazení vzorku střeva MHCII/EGFP mláděte kojeného 5 dní u samice C57BL/6 s aplikovanou maskou neuronové sítě. Barevně znázorněny jednotlivé buňky (různá barva buněk byla použita kvůli přehlednosti a neodpovídá konkrétnímu fenotypu).*

### 5.2.2. Detekce MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk ve střevě pomocí virtual slide mikroskopie

Mláďata kojená podle schématu (viz obr. 9) byla usmrcena a byly jim odebrány vzorky slepého, tenkého a tlustého střeva vždy 1., 3., 5. a 7. den kojení. Celkově byly připraveny a nasnímány u každého orgánu z každého dne 2–3 opakování. Vzorky byly barveny protilátkou proti CD45 resp. F4/80 a snímány virtual slide mikroskopem Zeiss Axio Scan Z1.

Stejně jako tomu bylo u embryí snímaných pomocí virtual slide mikroskopu ani v tomto případě nebylo zatím možné data správně analyzovat. Pro prezentaci výsledných dat jsem si zvolila tenké střevo značené protilátkou CD45 a tlusté střevo značené F4/80, obě odebraná z MHCII/EGFP mláděte 5. den kojení (viz obr. 26).



**Obr. 26** Vzorky střeva MHCII/EGFP mláděte myši odebrané 5. den kojení (kojeno u samice C57BL/6). (A) Vzorek tenkého střeva značeného CD45 (červeně CD45<sup>+</sup> buňky, modře jádra barvená DAPI, zelený signál MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky). (B) Vzorek tlustého střeva (červeně F4/80, modře značená jádra pomocí DAPI, zelený kanál pro MHCII/EGFP). (C) Přiblížení buněk střevního klku ve vzorku tlustého střeva (červeně F4/80, modře značená jádra pomocí DAPI, zelený kanál pro MHCII/EGFP). Snímáno mikroskopem Zeiss Axio Scan Z1, objektiv 20x.

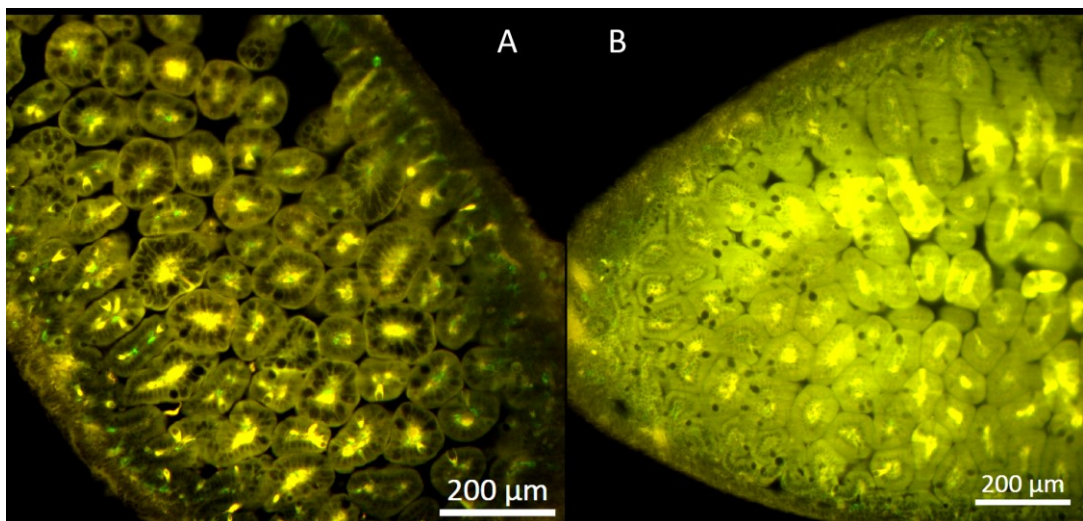
## 6. Diskuze

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací metod kvantifikace konkrétních buněčných populací a detekcí mateřských mikrochimerních populací buněk objevujících se během těhotenství a kojení ve tkáních potomka za využití speciálního MHCII/EGFP myšího *knock-in* modelu. Mikrochimérismus je relativně málo prostudovaný jev s možnými významnými dopady na zdraví a imunitní systém příjemce, což potvrzují již dříve publikované práce.<sup>64</sup> Vzhledem ke schopnosti těchto buněk migrovat do míst poškození by se mohlo jednat o potenciální zdroj buněk pro regenerativní medicínu (platí pro kmenové/progenitorové fetální buňky přenášené jak během těhotenství, tak během kojení<sup>102,120</sup>). Zajímavý je i jejich možný efekt při nádorových, autoimunitních onemocněních nebo transplantační medicíně.<sup>54,63,104</sup>

Pro odhalení mateřských buněk v těle potomka byl využit speciální myší model MHCII/EGFP a několik různých metod zahrnujících průtokovou cytometrii a dvě různé mikroskopické techniky. Kombinace těchto metod byla zvolena z toho důvodu, že u každé z nich dochází k částečné ztrátě informace a jejich spojením můžeme získat přesnější celkovou informaci. Hlavním nedostatkem průtokové cytometrie je, ztráta povědomí o konkrétní původní lokalizaci buněk v tkáni a obecně histologického kontextu. Její výhodou však je schopnost důkladné fenotypové analýzy buněčných populací a relativně rychlé zpracování. Naproti tomu mikroskopické přístupy s sebou přinášejí nevýhody v podobě větší časové náročnosti a problematického zpracování výsledných dat, vzhledem k jejich velikosti (v řádu stovek GB). Na druhou stranu mikroskopie nám poskytuje informace o lokalizaci buněk v kontextu tkáně a je možné rekonstruovat také původní 3D strukturu tkáně. Pro experimenty spojené s hledáním mateřských buněk transportovaných mateřským mlékem do těla potomka byly zvoleny tkáně střeva z toho důvodu, že jsou jednak v přímém kontaktu s mateřským mlékem a za druhé střevo je významným imunitním orgánem.

Před samotným sběrem dat bylo nejdříve nutné optimalizovat jednotlivé metody pro detekci takto vzácné minoritní buněčné populace. Celkově největším problémem u všech použitých metod byla vysoká míra autofluorescence u embryí i u orgánů kojených mláďat, která značně ztěžovala nebo dokonce znemožňovala následnou analýzu dat

(snížil se kontrast pozadí a specifického signálu). Zvýšená autofluorescence může být způsobena přítomností červených krvinek, které obsahují hemoglobin. Ten je přirozeně fluorescenční v různých vlnových délkách a může překrývat emisní/excitační spektra specifických fluoroforů.<sup>121,122</sup> Další hypotéza o které v souvislosti s vysokou mírou autofluorescence u embryí a mláďat uvažujeme je značné množství metabolitů/odpadních látek vznikajících u vyvíjejícího se organismu. V těle savců je běžně přítomna řada molekul s přirozenou fluorescencí včetně lipofuscinu nebo kolagenu.<sup>123</sup> Zároveň byla pozorována zvyšující se autofluorescence u déle fixovaných a pomaleji zpracovávaných vzorků (viz obr. 27). Tkáně byly fixovány ve formaldehydu, který sám o sobě není výrazně fluorescenční, ale během fixace dochází k modifikacím proteinů. Reakcí aldehydů (z formaldehydu) s aminy ve tkáni vznikají tzv. Schiffovy báze, které jsou vysoce fluorescenční.<sup>124</sup>



**Obr. 27** Porovnání míry autofluorescence u vzorků tenkého střeva MHCII/EGFP mláďátek knock-in myši starého 1 den při odlišné době trvání fixace. (A) délka fixace: 24 hodin. (B) délka fixace: 1 týden. Snímáno mikroskopem Zeiss Lightsheet Z.1, objektiv 20x.

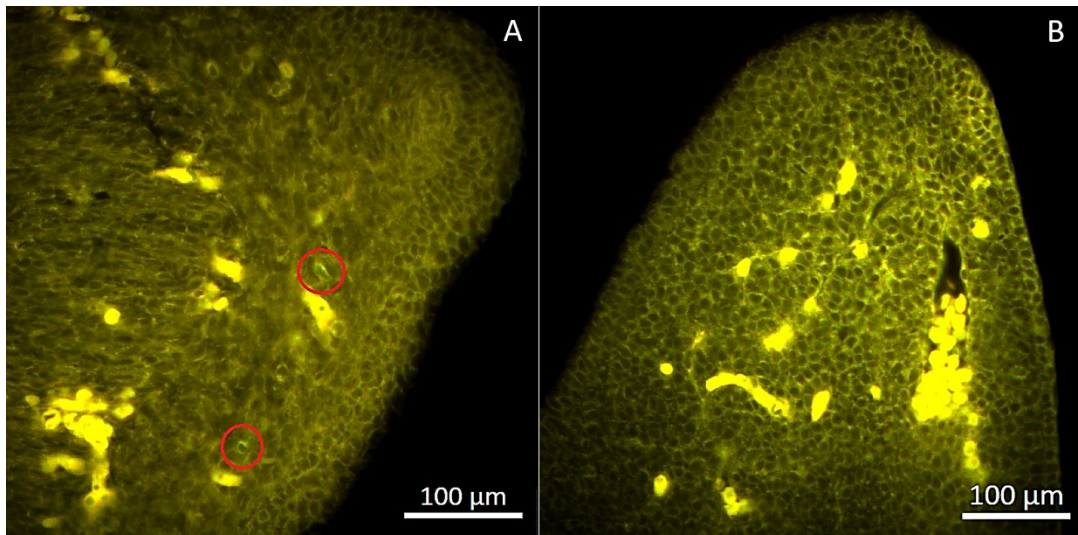
Při řešení problému s autofluorescencí vzorků se nabízejí různé možnosti pro každou z metod zvlášť. U průtokové cytometrie je možné značit erytrocyty specifickou protilátkou a při analýze tuto populaci odgateovat nebo značit jádra živých buněk (červené krvinky by se takto daly také odgateovat). Další možností je lýza eryrocytů ve vzorku už při samotné přípravě buněčné suspenze. Tato metoda s sebou ovšem přináší riziko zvýšené úmrtnosti i ostatních buněk. Navíc se zvyšují ztráty buněk vlivem většího množství kroků při manipulaci se vzorkem (jako je centrifugace apod.). Tak může dojít k

ovlivnění výsledků experimentu. U mikroskopických metod je možné změřit spektrum fluorescence a díky tomu následně během analýzy provést spektrální dekonvoluci (někdy se uvádí pod názvem spektrální unmixing), která by mohla zlepšit kontrast a umožnit tak lepší detekci buněk se specifickou fluorescencí.<sup>121,125</sup> Nabízí se také použití chemikálií schopných odstranit autofluorescenci jako je například *TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium)*.<sup>126</sup>

Pomocí průtokové cytometrie se nám nepodařilo prokázat specifickou přítomnost MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu C57BL/6. To může ukazovat na fakt, že při fyziologickém průběh těhotenství není potřeba aby se mateřské buňky zapojily do opravy poškození nebo nahrazovaly nefunkční části imunitního systému plodu.<sup>68,127</sup> Imunitní buňky jsou po počáteční infiltraci kompletně nahrazeny buňkami vlastního embrya, které je začíná produkovat. Tuto hypotézu potvrzuje i studie, která prokázala výskyt mateřských makrofágů v tkáních embrya pouze do 9,5 dne po oplození a později už ne<sup>34,36</sup>.

Při optimalizaci metody projasňování tkání byl upraven protokol pro přípravu projasňovacího roztoku CUBIC 2 (viz tabulka 6), protože původní roztok byl velice hustý, rychle krystalizoval a neměl ideální RI pro snímání light sheet mikroskopem. Objektiv light sheet mikroskopu má otočný kroužek, pomocí kterého je možné objektiv nastavit pro snímání podle konkrétní hodnoty RI roztoku, ve kterém vzorek snímáme. Jeho hodnota se měří vždy těsně před samotným snímáním.

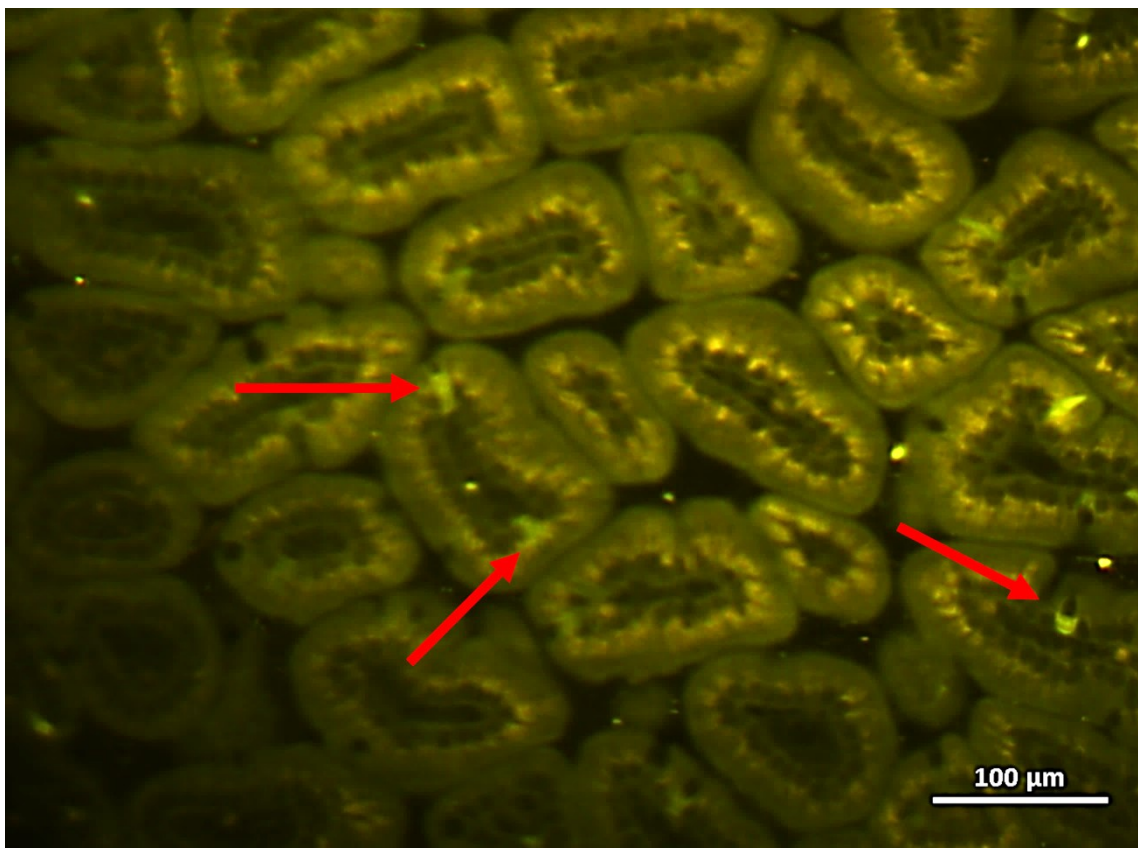
Snímání embryí (E13) pomocí light sheet mikroskopie bylo problematické kvůli samotné anatomii vzorku. Pevné tkáně jako je páteř nebo např. volné končetiny překáží při průchodu excitačního světelného listu a zamezují rovnoměrnému prosvícení celého vzorku (vytváří se stíny apod.). Navíc kvůli omezené velikosti. snímací komůrky mikroskopu je obtížná manipulace se snímaným vzorkem a zároveň je omezena maximální vzdálenost vzorku od objektivu. Pro budoucí experimenty tohoto typu by bylo vhodné odebrat jednotlivé orgány embrya pomocí mikromanipulačních metod a snímat je zvláště.<sup>128,129</sup> I přesto, že jsme při sběru dat na light sheet mikroskopu použily kromě laseru 488 nm navíc také laser 561 nm ve snaze odlišit nespecifickou autofluorescenci na pozadí (u vzorků střev to alespoň částečně pomohlo), signál MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryu byl stále příliš slabý (viz obr. 28) a buňky se nám pomocí neuronové sítě identifikovat a spočítat nepodařilo.



**Obr. 28** Porovnání fluorescence ve vzorcích myšního embrya (E13). (A) Embryo MHCII/EGFP. Červené kroužky ukazují těžko detekovatelné MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky ve vzorku. (B) Embryo C57BL/6. Snímáno mikroskopem Zeiss Lightsheet Z.1, objektiv 20x.

S ohledem na velikost nasnímaných dat při využití light sheet mikroskopie (celkem cca 8,5 TB u vzorků střeva a 657 GB u vzorků embryí) jsme se rozhodli pro jejich vyhodnocení vytvořením neuronové sítě. Její velkou výhodou je, že po natrénování na malé části dat je už schopná sama vyhodnotit zbytek objemu vzorku a tím ušetřit velké množství času. Navíc je tak vyloučen subjektivní pohled experimentátora a data nejsou tímto zkreslena. Při vytváření neuronové sítě byl jednou z překážek přirozený fenotyp vybrané buněčné populace. Antigen prezentující buňky zasahují svými výběžky do několika různých rovin a je riziko, že budou započítány jako několik buněk. Tento problém byl řešen tím, že po vycvičení sítě byly buňky propojené ve 3D (viz obr. 25) a díky tomu byla každá buňka započítána pouze jedenkrát. Naopak pokud dvě buňky leží příliš blízko u sebe nebo se dotýkají svými výběžky neuronová síť je započítá jako jeden objekt. Vzhledem ke slabému signálu MHCII/EGFP oproti pozadí z důvodu silné autofluorescence, zaznamenávala síť nejdříve velmi malé procento buněk, ale postupným trénováním (při opakované manuální segmentaci) jsme vytvořili síť schopnou detekovat množství MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk odpovídající reálným počtům buněk (viz obr. 24). Síť ale stále není bezchybná, některé buňky při tvorbě masky vynechává a bude nutné ji ještě zdokonalovat. U vyhodnocování vzorků střeva byl pro síť problematický také další buněčný typ střeva a tím jsou pohárkové buňky. Nejenom že vydávají velice silný fluorescenční signál, ale zároveň se na některých snímcích velice podobají hledaným APC

buňkám a neuronová síť je nedokázala vždy odlišit a započítávala je také (viz obr. 29). To se ukázalo jako zásadní překážka při aplikaci sítě na vzorky C57BL/6 embryí. I ve vzorcích kontrol, ve kterých byla přítomnost MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk vyloučena síť započítávala pozitivně identifikované objekty a při manuální kontrole se ve většině případů jednalo právě o zmíněné pohárkové buňky. Z těchto důvodů není možné získané výsledky správně hodnotit a je nutné vytvořit přesnější síť a zdokonalit také samotnou přípravu vzorků (s možností specifického značení pohlcených buněk).



**Obr. 29** Tenké střevo C57BL/6 mláděte. Červené šipky ukazují pohárkové buňky. Snímáno mikroskopem Zeiss Lightsheet Z.1, objektiv 20x.

Dalším mikroskopickým přístupem využitým pro detekci MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryích i ve střevech kojených mláďat byla virtual slide mikroskopie. Její výraznou výhodou je skvělé rozlišení, automatické snímání, které šetří čas a možnost snadného imunohistochemického značení. Vzhledem ke snímání jednotlivých řezů nedochází ke ztrátě informace a je vyloučen problém s neschopností proostřit hlouběji do vzorku jako je tomu u light sheet mikroskopie.<sup>130</sup>

Teoretickou výhodou pro analýzu těchto dat bylo značení jader, které by mohlo pomoci při zpracování dat, ale bohužel signál DAPI není ve vzorku rovnoměrně prosycen (jak je vidět na obrázcích v kapitole výsledky) a vytvořená neuronová síť na tyto změny intenzity nedokáže správně reagovat. Další překážkou při přípravě neuronové sítě bylo, že na rozdíl od snímání light sheet mikroskopem zde nebylo možné využít laser 561 nm, který nám u LSM sloužil pro lehké zlepšení kontrastu mezi specifickým EGFP signálem a nspecifickým pozadím, protože zde byl využit pro excitaci specifického signálu F4/80 resp. CD45 s využitím sekundární protilátky AlexaFluor 647. Proto neuronová síť nedokázala buňky najít a pro vyhodnocení těchto dat bude nutné využít jiný druh analýzy. Celkový objem dat získaných touto technikou byl 518 GB.

Poslední metodou využitou v této práci byla genotypizace, která byla zařazena z důvodu potřeby odlišit embrya C57BL/6 a MHCII/EGFP. Původní vybraný protokol (viz oddíl 4.2.2. Genotypizace) zahrnoval izolaci DNA pomocí NaOH s EDTA a Tris HCl. V PCR reakci byly využity dva páry primerů prostřednictvím, kterých je možné odlišit myši C57BL/6, MHCII/EGFP a heterozygota MHCII/EGFP. Na obr. 21 je znázorněn vzorový gel s viditelnými vzory signálů u jednotlivých kontrol. Tento výsledek se mi bohužel z ne zcela zřejmých důvodů nepodařilo zopakovat. Z toho důvodu byla postupně optimalizována teplota nasedání primerů, počet reakčních cyklů, množství DNA i množství primerů v reakci. I přesto se tuto metodu nepodařilo vhodně optimalizovat, a proto jsme později přistoupili k použití nových primerů, které pouze odhalují ve vzorku přítomnost EGFP, ale není možné podle nich specificky odlišit heterozygota. Pro naše účely to, ale stačí (potřeba odlišit embrya C57BL/6 a MHCII/EGFP heterozygot). Navíc byl v novém protokolu použit lyzační roztok na izolaci DNA s proteinázou K. Naše technické problémy mohla způsobovat původní izolace (nečistoty mohou zastavovat reakci a způsobovat „pozadí“ – nejsou vidět pouze čisté bandy). Metoda detekující specificky pouze EGFP se ukázala jako efektivní a vhodná pro naše účely. Vzorky DNA embryí využitých pro sběr dat v této práci jsou uchované v -20°C a budou použity na zpětné určení genotypu embryí.

Detekce vzácné buněčné populace přecházející mezi matkou a plodem/novorozencem z výše zmíněného není snadná, a proto bych se jí chtěla věnovat i v budoucnu během mého doktorského studia. K tomuto projektu mi byl letos udělen grant GA UK. Nevýhodou využití reportérového systému MHCII/EGFP je, že vzhledem



k tomu, že nedochází k amplifikaci signálu, může být fluorescence těžko detekovatelná při nízké úrovni exprese. Do budoucna proto bude potřeba zahrnout další experimentální vylepšení jakými mohou být nové modelové organismy (ROSA<sup>mt/mg</sup> – zde je možné pozorovat všechny mikrochimérické buňky, nikoliv pouze MHC<sup>+</sup> - nebo imunodeficientní myší kmeny Nu/nu a RAG/NOD, u nichž očekáváme vyšší procento přežívajících buněk). Dále se nabízí značení mikrochimérických buněk širší paletou protilátek nebo značení jader u vzorků pro LSFM pomocí DRAQ5. Jeho výhodou je, že rychle prostupuje tkáň a efektivně barví jádra. Neinterferuje s ostatními běžně používanými druhy fluorescenčního značení jako je tomu například při použití DAPI nebo Hoechst 33258. Jedná se totiž o barvivo s vlnovou délkou v oblasti "far red".<sup>131</sup> Při použití tohoto značení jader je možná relativně snadná segmentace a kvantifikace buněk s využitím běžně využívaného softwaru ImageJ.<sup>132</sup>

## 7. Závěr

Cílem předložené diplomové práce bylo vytvořit model pro studium maternálního mikrochimérismu a pomocí pokročilých histologických technik se pokusit tento jev popsat.

Podařilo se nám vyvinout myší model vhodný pro studium maternálního mikrochimérismu MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk vznikajícího během embryonálního vývoje a během kojení a optimalizovat část metod pro jeho výzkum.

Dalším cílem bylo určit konkrétní typy APC podílejících se na maternálním mikrochimérismu. Vzhledem k tomu, že jsme v embryu nedetekovali přítomnost MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk nemohli jsme provést jejich fenotypizaci.

Ve střevech kojených mláďat jsme byli schopni buňky částečně kvantifikovat, ale nebylo možné určit konkrétní typ.

Pomocí metody průtokové cytometrie se nám nepodařilo prokázat přítomnost maternálních MHCII/EGFP<sup>+</sup> buněk v embryích ve stádiu E13.

Zjistili jsme velkou míru autofluorescence ve zkoumaných vzorcích, která znesnadňovala analýzu získaných dat a do budoucna bude nutné se na tento jev více zaměřit a minimalizovat ho pomocí některého z výše navržených postupů.

U experimentů hledajících mateřské MHCII/EGFP<sup>+</sup> buňky ve střevech kojených mláďat jsme pro analýzu dat vytvořili neuronovou síť schopnou tyto buňky detekovat a kvantifikovat. Ale s ohledem na složitosti vyplývající z přirozeného fenotypu této tkáně bude nutné síť dále zdokonalit.

Celkově tato práce poukazuje na úskalí spojená se studiem mikrochimérismu a zamýšlí se nad možnými řešeními této problematiky.

## 8. Reference

1. Matzinger, P. The danger model: A renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
2. Beck, S. *et al.* Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* **401**, (1999).
3. Shiina, T., Inoko, H. & Kulski, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* **64**, 631–649 (2004).
4. O'Brien, C., Flower, D. R. & Feighery, C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Res.* **4**, (2008).
5. Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, (2013).
6. Cresswell, P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**, 505–507 (1996).
7. Shi, G. P. *et al.* Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J. Exp. Med.* **191**, (2000).
8. Denzin, L. K. & Cresswell, P. HLA-DM induces clip dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, (1995).
9. Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity* **26**, 79–92 (2007).
10. Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7922–7927 (2005).
11. Couture, A. *et al.* HLA-class II artificial antigen presenting cells in CD4+ T cell-based immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
12. Steimle, V., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiette, B. & Mach, B. Regulation of MHC class II expression by interferon- $\gamma$  mediated by the transactivator gene CIITA. *Science (80-. ).* **265**, 106–109 (1994).
13. Chang, C. H., Fontes, J. D., Peterlin, M. & Flavell, R. A. Class II transactivator (ciita) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes.

- J. Exp. Med.* **180**, (1994).
14. Baecher-Allan, C., Wolf, E. & Hafler, D. A. MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **176**, 4622–4631 (2006).
  15. Holling, T. M., Schooten, E., Langerak, A. W. & Van Den Elsen, P. J. Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies. *Blood* **103**, (2004).
  16. Hepworth, M. R. *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4 + T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* **498**, 113–117 (2013).
  17. Oliphant, C. J. *et al.* MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* **41**, (2014).
  18. Perrigoue, J. G. *et al.* MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote TH2 cytokine-dependent immunity. *Nat. Immunol.* **10**, 697–705 (2009).
  19. Vono, M. *et al.* Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood* **129**, 1991–2001 (2017).
  20. Padigel, U. M., Lee, J. J., Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect. Immun.* **74**, (2006).
  21. Hershberg, R. M. *et al.* Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **102**, (1998).
  22. Wosen, J. E. *et al.* Human intestinal enteroids model MHC-II in the gut epithelium. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
  23. Yang, S. J. *et al.* The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: Implications in cortical thymocyte development. *Int. Immunol.* **18**, (2006).
  24. Nadafi, R. *et al.* Lymph Node Stromal Cells Generate Antigen-Specific Regulatory T Cells and Control Autoreactive T and B Cell Responses. *Cell Rep.* **30**, 4110-4123.e4 (2020).
  25. Wood, W. *et al.* Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* (2000).
  26. Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S. & Martin, P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell*

- Sci.* (1994).
27. Yamazaki, S. *et al.* A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
  28. Lacaud, G. & Kouskoff, V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Experimental Hematology* (2017).  
doi:10.1016/j.exphem.2016.12.009
  29. Kostovic-Knezevic, L. & Gajovic, S. Human embryo before ultrasound visualization. *Ultrasound Rev. Obstet. Gynecol.* **5**, 1–8 (2005).
  30. Downs, K. M. & Davies, T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255–1266 (1993).
  31. Ferkowicz, M. J. & Yoder, M. C. Blood island formation: Longstanding observations and modern interpretations. *Exp. Hematol.* **33**, 1041–1047 (2005).
  32. Johnson, S. A. *et al.* CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* **130**, 4393–4403 (2003).
  33. Tober, J. *et al.* The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* **109**, 1433–1441 (2007).
  34. Bertrand, J. Y. *et al.* Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**, 3004–3011 (2005).
  35. McGrath, K. E. *et al.* Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. *Cell Rep.* **11**, 1892–1904 (2015).
  36. Balounová, J. *et al.* Toll-like receptor 2 expression on c-kit<sup>+</sup> cells tracks the emergence of embryonic definitive hematopoietic progenitors. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
  37. Yoshimoto, M. *et al.* Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence. *Blood* **119**, (2012).
  38. Yoshimoto, M. *et al.* Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1468–1473 (2011).

39. Stremmel, C. *et al.* Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
40. Mass, E. *et al.* Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science (80-. ).* **353**, (2016).
41. Böiers, C. *et al.* Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* (2013). doi:10.1016/j.stem.2013.08.012
42. Masuda, K. *et al.* Thymic Anlage Is Colonized by Progenitors Restricted to T, NK, and Dendritic Cell Lineages. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.174.5.2525
43. De Andrés, B. *et al.* The first 3 days of B-cell development in the mouse embryo. *Blood* (2002). doi:10.1182/blood-2002-03-0809
44. Kumaravelu, P. *et al.* Quantitative developmental anatomy of definite haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): Role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* (2002).
45. Ottersbach, K. & Dzierzak, E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev. Cell* (2005). doi:10.1016/j.devcel.2005.02.001
46. Al-Drees, M. A. *et al.* Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells International* (2015). doi:10.1155/2015/571893
47. Pujal, J. M. *et al.* Early hematopoietic microchimerism predicts clinical outcome after kidney transplantation. *Transplantation* **84**, 1103–1111 (2007).
48. Utter, G. H. *et al.* Blood transfusion is associated with donor leukocyte microchimerism in trauma patients. *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care* **57**, 702–708 (2004).
49. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S. & DeMaria, M. A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 705–8 (1996).
50. Loubière, L. S. *et al.* Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab. Investig.* **86**, 1185–1192 (2006).
51. Boddy, A. M., Fortunato, A., Wilson Sayres, M. & Aktipis, A. Fetal microchimerism and maternal health: A review and evolutionary analysis of cooperation and conflict beyond

- the womb. *BioEssays* **37**, 1106–1118 (2015).
52. Fujiki, Y., Johnson, K. L., Tighiouart, H., Peter, I. & Bianchi, D. W. Fetomaternal Trafficking in the Mouse Increases as Delivery Approaches and Is Highest in the Maternal Lung1. *Biol. Reprod.* **79**, 841–848 (2008).
  53. Kinder, J. M., Stelzer, I. A., Arck, P. C. & Way, S. S. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 483–494 (2017).
  54. Cha, D. *et al.* Cervical cancer and microchimerism. *Obstet. Gynecol.* **102**, 774–781 (2003).
  55. Lepez, T. *et al.* Fetal microchimeric cells in blood of women with an autoimmune thyroid disease. *PLoS One* **6**, (2011).
  56. Roy, E. *et al.* Biphasic recruitment of microchimeric fetal mesenchymal cells in fibrosis following acute kidney injury. *Kidney Int.* **85**, 600–610 (2014).
  57. Khosrotehrani, K. *et al.* Pregnancy Allows the Transfer and Differentiation of Fetal Lymphoid Progenitors into Functional T and B Cells in Mothers. *J. Immunol.* **180**, (2008).
  58. Khosrotehrani, K., Johnson, K. L., Guégan, S., Stroh, H. & Bianchi, D. W. Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **66**, (2005).
  59. Koopmans, M. *et al.* Chimerism occurs in thyroid, lung, skin and lymph nodes of women with sons. *J. Reprod. Immunol.* **78**, 68–75 (2008).
  60. Dutta, P. *et al.* Microchimerism is strongly correlated with tolerance to noninherited maternal antigens in mice. *Blood* **114**, 3578–3587 (2009).
  61. Owen, R. D., Wood, H. R., Foord, A. G., Sturgeon, P. & Baldwin, L. G. EVIDENCE FOR ACTIVELY ACQUIRED TOLERANCE TO Rh ANTIGENS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **40**, (1954).
  62. Ichinohe, T. *et al.* Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood* **104**, 3821–3828 (2004).
  63. Nijagal, A. *et al.* Decreased risk of graft failure with maternal liver transplantation in patients with biliary atresia. *Am. J. Transplant.* **12**, 409–419 (2012).
  64. Mold, J. E. *et al.* Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal

- regulatory T cells in utero. *Science* **322**, 1562–5 (2008).
65. Maloney, S. *et al.* Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J. Clin. Invest.* **104**, 41–7 (1999).
  66. Götherström, C., Johnsson, A. M., Mattsson, J., Papadogiannakis, N. & Westgren, M. Identification of maternal hematopoietic cells in a 2nd-trimester fetus. *Fetal Diagn. Ther.* **20**, (2005).
  67. Jonsson, A. M., Uzunel, M., Götherström, C., Papadogiannakis, N. & Westgren, M. Maternal microchimerism in human fetal tissues. doi:10.1016/j.ajog.2007.09.047
  68. Wrenshall, L. E., Stevens, E. T., Smith, D. R. & Miller, J. D. Maternal microchimerism leads to the presence of interleukin-2 in interleukin-2 knock out mice: Implications for the role of interleukin-2 in thymic function. *Cell. Immunol.* **245**, 80–90 (2007).
  69. de Bellefon, L. M. *et al.* Cells from a vanished twin as a source of microchimerism 40 years later. *Chimerism* **1**, (2010).
  70. Martin, C. R., Ling, P. R. & Blackburn, G. L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. *Nutrients* **8**, (2016).
  71. Gura, T. Nature's first functional food. *Science* (2014). doi:10.1126/science.345.6198.747
  72. Asakuma, S. *et al.* Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J. Biol. Chem.* (2011). doi:10.1074/jbc.M111.248138
  73. Sela, D. A. & Mills, D. A. Nursing our microbiota: Molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology* (2010). doi:10.1016/j.tim.2010.03.008
  74. Ruiz, L. *et al.* Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
  75. Kordy, K. *et al.* Contributions to human breast milk microbiome and enteromammary transfer of *Bifidobacterium breve*. *PLoS One* **15**, (2020).
  76. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F. & Chassard, C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ. Microbiol.* **16**, (2014).
  77. Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* **92**, (2007).



78. Damaceno, Q. S. *et al.* Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **9**, (2017).
79. Macpherson, A. J. & Uhr, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science (80-. )*. **303**, (2004).
80. Perez, P. F. *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**, (2007).
81. Rodríguez, J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Adv. Nutr.* **5**, 779–784 (2014).
82. Díaz-Ropero, M. P. *et al.* Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J. Appl. Microbiol.* **102**, (2007).
83. Bisgaard, H. *et al.* Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, (2011).
84. Gholizadeh, P. *et al.* Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease. *Microbial Pathogenesis* **127**, (2019).
85. Arnoldussen, I. A. C. *et al.* Early intake of long-chain polyunsaturated fatty acids preserves brain structure and function in diet-induced obesity. *J. Nutr. Biochem.* **30**, 177–188 (2016).
86. Birch, E. E., Hoffman, D. R., Uauy, R., Birch, D. G. & Prestidge, C. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr. Res.* **44**, (1998).
87. Morais, T. C. *et al.* Temporal fluctuations of cytokine concentrations in human milk. *Biol. Rhythm Res.* **46**, (2015).
88. Maheshwari, A., Christensen, R. D. & Calhoun, D. A. ELR+ CXC chemokines in human milk. *Cytokine* **24**, (2003).
89. Groer, M. *et al.* Cytokines, chemokines, and growth factors in banked human donor milk for preterm infants. *J. Hum. Lact.* **30**, (2014).
90. Rath, T. *et al.* The immunologic functions of the neonatal FC receptor for IGG. *J. Clin. Immunol.* **33**, (2013).

91. Roux, M. E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M., Weisz-Carrington, P. & Lamm, M. E. Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland\*. *J. Exp. Med.* **146**, (1977).
92. Brandtzaeg, P. The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands. *J. Pediatr.* **156**, (2010).
93. Hassiotou, F. *et al.* Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin. Transl. Immunol.* **2**, (2013).
94. Indumathi, S., Dhanasekaran, M., Rajkumar, J. S. & Sudarsanam, D. Exploring the stem cell and non-stem cell constituents of human breast milk. *Cytotechnology* **65**, (2013).
95. Trend, S. *et al.* Leukocyte populations in human preterm and term breast milk identified by multicolour flow cytometry. *PLoS One* **10**, (2015).
96. Bedin, A. S. *et al.* MAIT cells, TCR  $\gamma\delta$ + cells and ILCs cells in human breast milk and blood from HIV infected and uninfected women. *Pediatr. Allergy Immunol.* **30**, (2019).
97. C rbulo-Vázquez, A. *et al.* Characterization of CD127- CD25++ Treg from human colostrum. *Am. J. Reprod. Immunol.* **79**, (2018).
98. Baban, B., Malik, A., Bhatia, J. & Yu, J. C. Presence and profile of innate lymphoid cells in human breast milk. *JAMA Pediatrics* **172**, (2018).
99. Zhou, L. *et al.* Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: Through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology* **101**, (2000).
100. Cabinian, A. *et al.* Transfer of maternal immune cells by breastfeeding: Maternal cytotoxic t lymphocytes present in breast milk localize in the peyer's patches of the nursed infant. *PLoS One* **11**, (2016).
101. Hassiotou, F. & Geddes, D. T. Immune Cell-Mediated Protection of the Mammary Gland and the Infant during Breastfeeding. *Adv. Nutr.* **6**, (2015).
102. Ninkina, N. *et al.* Stem cells in human breast milk. *Human Cell* **32**, (2019).
103. Aydın, M. Ş., Yiğit, E. N., Vatandaşlar, E., Erdoğan, E. & Öztürk, G. Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
104. Lepez, T. *et al.* Fetal microchimeric cells in blood of women with an autoimmune thyroid disease. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0029646

105. Susaki, E. A. *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, (2014).
106. Wolenski, J. S. & Julich, D. Fluorescence Microscopy Gets Faster and Clearer: Roles of photochemistry and Selective Illumination. *Yale J. Biol. Med.* **87**, 21–32 (2014).
107. Huisken, J. & Stainier, D. Y. R. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* (2009). doi:10.1242/dev.022426
108. Kaur, P., Saunders, T. E. & Tolwinski, N. S. Coupling optogenetics and light-sheet microscopy, a method to study Wnt signaling during embryogenesis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
109. Kaufmann, A., Mickoleit, M., Weber, M. & Huisken, J. Multilayer mounting enables long-term imaging of zebrafish development in a light sheet microscope. *Dev.* **139**, (2012).
110. Takagi, C. *et al.* Transgenic *Xenopus laevis* for live imaging in cell and developmental biology. *Development Growth and Differentiation* **55**, (2013).
111. Icha, J. *et al.* Using light sheet fluorescence microscopy to image zebrafish eye development. *J. Vis. Exp.* **2016**, (2016).
112. Zheng, Z. *et al.* Hepatitis C virus mediated chronic inflammation and tumorigenesis in the humanised immune system and liver mouse model. *PLoS One* **12**, (2017).
113. Azzarelli, R. *et al.* Multi-site Neurogenin3 Phosphorylation Controls Pancreatic Endocrine Differentiation. *Dev. Cell* **41**, (2017).
114. Barth, C. W., Schaefer, J. M., Rossi, V. M., Davis, S. C. & Gibbs, S. L. Optimizing fresh specimen staining for rapid identification of tumor biomarkers during surgery. *Theranostics* **7**, (2017).
115. Cha, M., Um, S. W., Kwon, M., Nam, T. S. & Lee, B. H. Repetitive motor cortex stimulation reinforces the pain modulation circuits of peripheral neuropathic pain. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
116. Cubitt, A. B. *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 448–455 (1995).
117. Zhang, G., Gurtu, V. & Kain, S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 707–711 (1996).

118. Boes, M. *et al.* T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges mhc class ii transport. *Nature* **418**, 983–988 (2002).
119. Susaki, E. A. *et al.* Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc.* (2015). doi:10.1038/nprot.2015.085
120. Zeng, X. X. *et al.* Pregnancy-associated progenitor cells differentiate and mature into neurons in the maternal brain. *Stem Cells Dev.* **19**, 1819–1830 (2010).
121. McRae, T. D., Oleksyn, D., Miller, J. & Gao, Y. R. Robust blind spectral unmixing for fluorescence microscopy using unsupervised learning. *PLoS One* **14**, (2019).
122. Dickinson, M. E., Bearman, G., Tille, S., Lansford, R. & Fraser, S. E. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *Biotechniques* **31**, (2001).
123. Croce, A. C. & Bottiroli, G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: A tool for biomedical research and diagnosis. *Eur. J. Histochem.* **58**, (2014).
124. Metz, B. *et al.* Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: Reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* **279**, 6235–6243 (2004).
125. Dickinson, M. E., Bearman, G., Tille, S., Lansford, R. & Fraser, S. E. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *Biotechniques* **31**, 1272–1278 (2001).
126. Whittington, N. C. & Wray, S. Suppression of Red Blood Cell Autofluorescence for Immunocytochemistry on Fixed Embryonic Mouse Tissue. *Curr. Protoc. Neurosci.* **81**, (2017).
127. Arvola, M. *et al.* Immunoglobulin-Secreting Cells of Maternal Origin Can Be Detected in B Cell-Deficient Mice<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* **63**, 1817–1824 (2000).
128. Aresh, B. & Peuckert, C. Dissection and culture of mouse embryonic kidney. *J. Vis. Exp.* **2017**, (2017).
129. Sánchez, N. *et al.* Tracking morphological complexities of organ development in culture. *Mech. Dev.* **154**, 179–192 (2018).
130. Treanor, D. Virtual slides: an introduction. *Diagnostic Histopathol.* **15**, 99–103 (2009).
131. Mari, P. O. *et al.* Influence of the live cell DNA marker DRAQ5 on chromatin-associated

processes. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 848–855 (2010).

132. Schwendy, M., Unger, R. E., Bonn, M. & Parekh, S. H. Automated cell segmentation in Fiji® using the DRAQ5 nuclear dye. *BMC Bioinformatics* **20**, (2019).