

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Elena Golovina

**Zánětlivé faktory v celiakii a jejich vliv na monocyty periferní krve**

Celiac disease-related inflammatory factors and their effect on peripheral blood monocytes

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Daňková, PhD.

Konzultant: Mgr. Iva Brynychová

Praha, 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci „Zánětlivé faktory v celiakii a jejich vliv na monocyty periferní krve“ jsem vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlínny Daňkové, Ph.D., s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury na konci práce.

V Praze dne 30.4.2018

Elena Golovina

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení, cenné rady a tematické připomínky k diplomové práci. Dále děkuji konzultantce Mgr. Ivě Brynychové za veškerou její pomoc při zpracování mé diplomové práce a kolektivu laboratoře Molekulární antropologie. Na závěr bych chtěla poděkovat všem pacientům s celiakií a zdravým dárcům za darování krve na experimenty.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1	Celiakie .....	10
1.1.1	Environmentální faktory.....	12
1.1.2	Imunologické faktory .....	13
1.1.3	Genetické faktory .....	16
1.2	Cytokiny.....	16
1.2.1	Klíčové cytokiny v patogenezi celiakie.....	17
1.2.2	Signální dráhy cytokinů.....	17
1.2.3	Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ).....	18
1.2.4	TNF- $\alpha$ .....	19
1.2.5	Interleukin-6 (IL-6).....	21
1.3	Interferon regulující faktor 1 (IRF1).....	23
1.3.1	Vztah IRF1 a celiakie .....	23
1.3.2	Vliv IRF1 na imunitní buňky .....	24
1.4	Vybrané markery stanovující vliv IRF1 na monocyty.....	26
1.4.1	CD163.....	26
1.4.2	CD95 (Fas) .....	27
1.4.3	IL-10 .....	27
1.5	Monocyty .....	28
1.5.1	Typy monocytů.....	28
<b>2</b>	<b>Předpoklady a cíle diplomové práce.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>31</b>
3.1	Pacienti.....	31
3.2	Optimalizace postupů pomocí buněčné linie THP1 .....	33
3.2.1	Optimalizace délky stimulace THP1 buněk cytokiny .....	33
3.2.2	Výběr cytokinů pro stimulaci monocytů – optimalizace na THP1 buňkách.....	37
3.2.3	Kultivace a stimulace buněk THP1 .....	39

3.2.4	Izolace RNA .....	40
3.2.5	Reverzně transkriptázová polymerázová reakce (RT PCR) .....	42
3.3	Studium exprese IRF1 mRNA na monocytech.....	43
3.3.1	Separace periferních mononukleárních buněk krve (PBMCs) z plné krve – Ficoll Paque	43
3.3.2	Kultivace a stimulace monocytů.....	44
3.3.3	Reverzně transkriptázová polymerázová reakce (RT PCR) .....	46
3.3.4	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real Time PCR/QPCR).....	48
3.3.5	Statistické zpracování .....	50
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>51</b>
4.1	Exprese IRF1 mRNA monocyty recentních pacientů a pacientů na bezlepkové dietě...51	
4.2	Exprese IRF1 mRNA monocyty pacientů na bezlepkové dietě a zdravých dárců .....	54
4.3	Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty .....	58
4.3.1	Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty CD-GFD pacientů.....	59
4.3.2	Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty zdravých dárců .....	60
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>73</b>

## Abstrakt

**Úvod:** Celiakie je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, které vzniká ztrátou orální tolerance lepku u geneticky predisponovaných jedinců. Při celiakii u pacientů byly pozorovány zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů (např. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) v tenkém střevě a v periferní krvi. Tyto cytokiny mají schopnost zvyšovat expresi interferon regulujícího faktoru 1 (IRF1), který je potenciálním hráčem v patogenezi celiakie. IRF1 hraje roli v apoptóze, diferenciaci a protizánětlivé reakci různých imunitních buněk. Monocyty jsou důležitou složkou imunitního systému. Širokou paletu jejich funkcí jim umožňují plnit membránové receptory, jejichž expresi může vyvolávat mimo jiné i IRF1. Pro objasnění vlivu IRF1 na patogenezi celiakie jsme se v této pilotní studii zaměřili na cirkulující monocyty a na i) detekování změn monocytární exprese IRF1 mRNA v zánětlivé prostředí u pacientů s celiakií (recentních, rCD, i dodržujících rok a déle bezlepkovou dietu, CD-GFD), a ii) následně na odhalení vlivu IRF1 na monocyty pomocí markerů apoptózy (CD95) a protizánětlivé reakce (CD163 a IL-10).

**Materiál a metody:** Do studie bylo zahrnuto 15 pacientů s celiakií (5 rCD a 10 CD-GFD) a 10 zdravých dárců jako kontroly. Pro stanovení hladin mRNA studovaných cytokinů a faktorů (IRF1, CD95, CD163, IL-10) jsme z monocytů získaných pomocí FicollPaque denzitní gradientové separace a následné adheze izolovali RNA; kvantitativní RNA testování bylo provedeno metodou QPCR s *PGKI* jako endogenní kontrolou.

**Výsledky:** Hladiny IRF1 mRNA u monocytů od recentních pacientů, pacientů na bezlepkové dietě a od zdravých dárců byly po stimulaci různými kombinacemi cytokinů (IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6) signifikantně zvýšené. U recentních pacientů byl nárůst exprese šestinásobný ( $p < 0,05$ ), u pacientů na bezlepkové dietě 7,7násobný ( $p < 0,0001$ ) a u zdravých dárců sedminásobný ( $p < 0,0001$ ). Expresí cílových markerů CD95, CD163 a IL-10 u monocytů od CD-GFD stimulovaných IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  vykazovaly trendy zvýšené exprese apoptotického markeru CD95 mRNA a snížené exprese protizánětlivého markeru IL-10 mRNA ( $p = \text{NS}$ ); snížení exprese CD163 mRNA u stimulovaných monocytů oproti monocytům bez cytokinů bylo signifikantní ( $p = 0,008$ ). U monocytů od HC byly pozorovány statisticky nevýznamné trendy zvýšené exprese apoptotického markeru CD95 mRNA a snížené exprese protizánětlivých markerů CD163 a IL-10 ( $p = \text{NS}$ ). Míra exprese IRF1 mRNA nekoreluje s žádným z vybraných markerů ani u monocytů zdravých dárců, ani u pacientů na bezlepkové dietě ( $p = \text{NS}$ ).

**Závěr:** Výsledky naznačují, že zánětlivé prostředí reprezentované cytokiny IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, které jsou přítomny ve zvýšené míře v séru recentních pacientů, vede u monocytů ke zvýšení exprese IRF1 mRNA, která může následně nastartovat u monocytů apoptózu zvýšením exprese

CD95 mRNA a poklesem exprese protizánětlivých markerů CD163 mRNA a IL-10 mRNA může ukazovat na snížení imunitní odpovědi monocytů u těchto pacientů.

**Klíčová slova:** celiakie, monocyty, cytokiny, interferon regulující faktor 1 (IRF1), apoptóza, zánět.

## Abstract

**Introduction:** Celiac disease is an organ-specific autoimmune disease that results in loss of oral tolerance of gluten in genetically predisposed individuals. Increased levels of inflammatory cytokines (eg IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) in the small intestine and peripheral blood have been observed in patients with celiac disease. These cytokines have the ability to increase the expression of interferon regulatory factor 1 (IRF1), which is a potential player in the pathogenesis of celiac disease. IRF1 plays a role in apoptosis, differentiation and anti-inflammatory response of various immune cells. Monocytes are an important component of the immune system. A wide variety of their functions allow them to exert membrane receptors, whose expression may cause, among other things, by IRF1. To clarify the effects of IRF1 on the pathogenesis of celiac disease we have focused on circulating monocytes in this pilot study and (i) detection changes in the monocytic expression of IRF1 mRNA in inflammatory environments in patients with celiac disease (recent, rCD and adherent one year and longer gluten-free diet, CD-GFD), and ii) subsequently to reveal the effect of IRF1 on monocytes by apoptosis markers (CD95) and anti-inflammatory responses markers (CD163 and IL-10).

**Material and methods:** The study includes 15 patients with celiac disease (5 rCD and 10 CD-GFD) and 10 healthy donors as controls. For the determination the mRNA levels of the studied factor and cytokines (IRF1, CD95, CD163, IL-10), we isolated RNA from the monocytes, which was obtained using FicollPaque density gradient separation; quantitative RNA testing was performed by the method of QPCR with *PGK1* as endogenous control.

**Results:** The levels of IRF1 mRNA in monocytes from recent patients, gluten-free patients and healthy donors were significantly increased after stimulation with different cytokine combinations (IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6). In recent patients the expression increased by six times ( $p < 0.05$ ), in patients on a gluten-free diet 7.7 times ( $p < 0.0001$ ) and 7 times in healthy donors ( $p < 0.0001$ ). Expression of target markers CD95, CD163 and IL-10 in IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  stimulated monocytes from CD-GFD patients showed trends in increased expression of apoptotic marker CD95 mRNA and decreased expression of anti-inflammatory marker IL-10 mRNA ( $p = \text{NS}$ ); reduction of CD163 mRNA expression in stimulated monocytes compared to cytokine-free monocytes was significant ( $p = 0.008$ ). In monocytes from HC, were observed statistically insignificant trends of increased expression of apoptotic marker CD95 mRNA and decreased expression of anti-inflammatory markers CD163 and IL-10 ( $p = \text{NS}$ ). However, expression of IRF1 mRNA did not correlate with any of the selected markers, nor in monocytes of healthy donors, nor in patients on gluten-free diet ( $p = \text{NS}$ ).



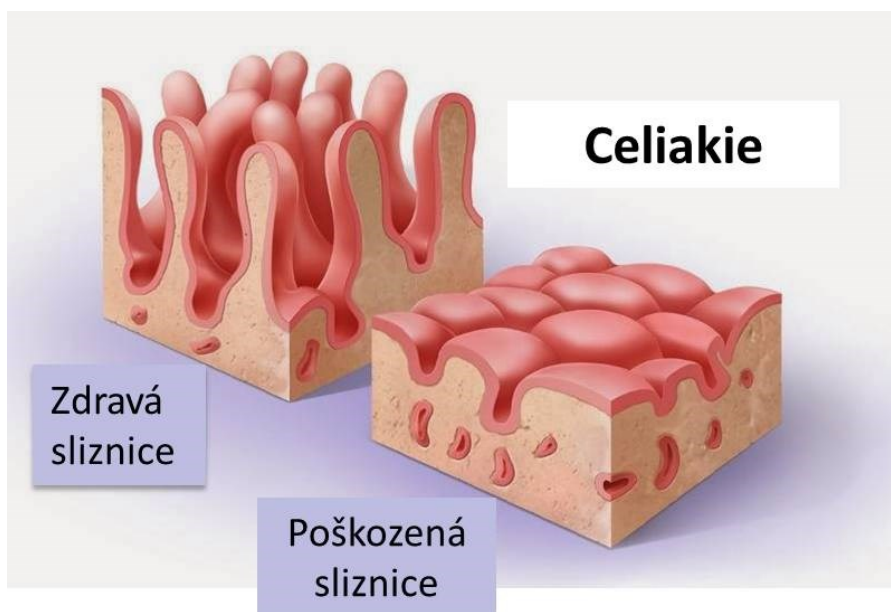
**Conclusion:** The results suggest that the inflammatory environment represented by cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, which are present in increased levels in the serum of recent patients, leads to increased expression of IRF1 mRNA in monocytes, which can subsequently trigger apoptosis monocytes by increasing CD95 expression mRNA and decrease the expression of anti-inflammatory markers CD163 mRNA and IL-10 mRNA. This may indicate a reduction in the immune response of monocytes in these patients.

**Key words:** celiac disease, monocytes, cytokines, interferon regulatory factor 1 (IRF1), apoptosis, inflammation.

# 1 Úvod

## 1.1 Celiakie

Celiakie (CD) je orgánově specifické autoimunitní onemocnění, které vzniká ztrátou orální tolerance lepku u geneticky predisponovaných jedinců. U pacientů s nově diagnostikovanou (= aktivní formou) celiakií, tedy u recentních pacientů (rCD) vede konzumace lepku k zánětlivé reakci v tenkém střevě, ta způsobí atrofii klků tenkého střeva (Obr. 1) (Kapur et al. 2004).



**Obr. 1:** Sliznice tenkého střeva zdravého člověka a pacienta s celiakií (totální atrofie mikrokلكů)  
(Upraveno podle: URL 1)

Tuto autoimunitní reakci vyvolávají peptidy lepku, autoantigenem je zde tkáňová transglutamináza 2 (TG2) (Marsh 1992). Hlavním nejcitlivějším a specifickým sérologickým markerem celiakie jsou anti-transglutaminázové IgA nebo anti-endomisiální protilátky. Zvýšené hladiny protilátek se detekují pomocí sérologického testu (Briani et al. 2008); pokud je hladina protilátek v séru zvýšena, přistupuje se k provedení střevní biopsie. V případě, že je u pacienta vysoké podezření na celiakii na základě dalších klinických faktorů, je biopsie indikována i v případě negativního sérologického testu. Pozitivní identifikace střevních abnormalit v rozmezí od téměř normální architektury klků se zvýšenou intraepiteliální lymfocytózou až po naprostou atrofii klků (Marsh 1992) vede k předběžné kompletní diagnóze celiakie, po které by mělo následovat dodržování bezlepkové diety, a teprve na základě zlepšení jako reakce na tuto bezlepkovou stravu se provádí konečná diagnóza celiakie (Briani et al. 2008).

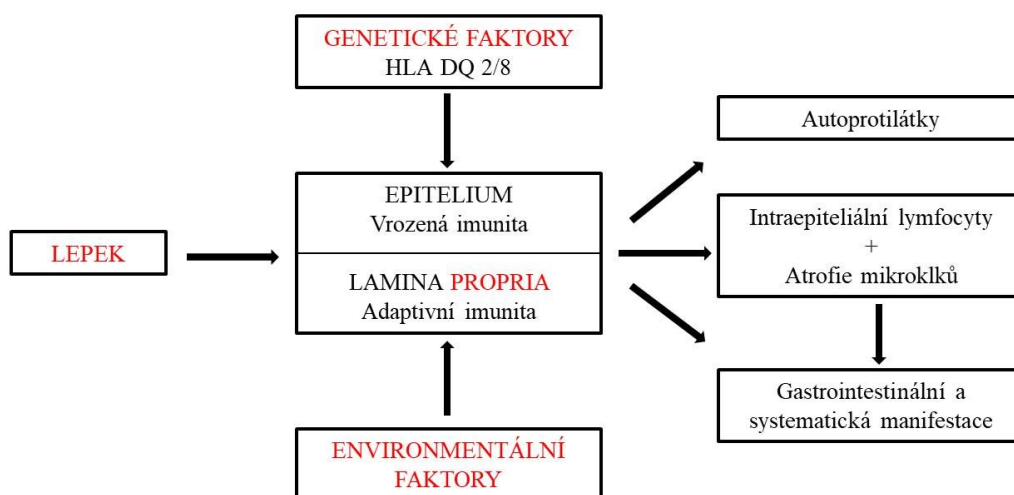
Symptomy charakteristické pro celiakii i jejich projevy jsou hodně variabilní. U dětí se onemocnění projevuje především těmito symptomy: neprospívání, malý vzrůst, opožděná puberta, chronický průjem, steatorrhea, břišní distenze a anémie. Dospělí v klasickém případě mají: chronický průjem, břišní distenze a bolest, slabost a malabsorpci. Nicméně, hodně pacientů má pouze minimální nebo dokonce žádné gastrointestinální příznaky (Briani et al. 2008). Při celiakii mají pacienti zánět tenkého střeva, tento zánět se však projeví v celém organismu (např. anémie, osteoporóza, neurologické problémy, herpetiformní dermatitida) (Kapur et al. 2004). Zánět může být detekovatelný také na periférii, nejen ve střevní mukóze, ale např. i v séru recentních pacientů jsou detekovatelné zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů jako IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  nebo IL-6 (Kapur et al. 2004; Lahat et al. 1999) či zvýšená exprese TLR na monocytech (Brynychová et al. 2016).

V současné době je jediným způsobem léčby celiakie úplné vyloučení lepku a souvisejících proteinů, které jsou obsaženy v pšenici, žitu a ječmenu, ze stravy. Tuto dietu pacient musí dodržovat celý život. Zlepšení příznaků obecně začíná již v průběhu prvních dnů až týdnů po zahájení bezlepkové diety, zatímco plné slizniční zotavení obvykle trvá déle. Úroveň anti-TG2 a anti-gliadin protilátek obvykle klesá po odstranění lepku ze stravy, ale může vyžadovat mnoho měsíců nebo dokonce let, než protilátky úplně zmizí (Briani et al. 2008).

Celiakie je jednou z nejčastějších poruch vyžadujících celoživotní léčbu v Evropě, která ovlivňuje přibližně 1 % z celkové populace. Je běžnou nemocí také v Severní Africe, na Středním Východě a v Indii (Lionetti et al. 2015). CD postihuje přibližně 1 % populace Spojených Států Ameriky a je vidět jak u dětí, tak i u dospělých (Kagnoff 2007). Velké rozšíření CD není překvapující vzhledem k tomu, že její příčinné faktory (HLA predisponující genotypy a konzumace potravin obsahujících obilný lepek) ukazují celosvětovou distribuci (Lionetti et al. 2015).

Patogeneze celiakie zahrnuje komplexní vzájemné působení environmentálních, genetických a imunologických faktorů. Lepek a související proteiny vyvolají vrozenou a adaptivní imunitní odpověď v tenkém střevě, která vede k poškození sliznice. Geny kódující II. třídu leukocytárních antigenů člověka HLA-DQ2 a -DQ8 jsou úzce spojeny s nemocí a jsou nalezeny u většiny pacientů s celiakií. Non-HLA geny hrají roli při celiakii také. Imunologická reakce na lepek obsahuje reaktivitu protilátek na proteiny lepku a autoantigen TG2, reakce CD4+ T lymfocytů na lepek, zvýšený počet intraepiteliálních CD8+ T lymfocytů a zvýšené hladiny řady cytokinů a chemokinů (Briani et al. 2008).

## Patogeneze celiakie



**Obr. 2:** Patogeneze celiakie. Komplexní vzájemné působení environmentálních, genetických a imunologických faktorů.

*(Upraveno podle: Green et al. 2015)*

Pochopení molekulárních mechanismů vzniku celiakie může pomoci najít nové způsoby diagnostiky a léčení onemocnění.

### 1.1.1 Environmentální faktory

Kromě hlavního iniciátoru vzniku celiakie, lepku, existují ještě další environmentální faktory a jejich role při vzniku celiakie je důležitá. K takovým faktorům patří např. doba kojení, věk, kdy je lepek zaveden do stravy (Ivarsson et al. 2002), užívání antibiotik (Lorusso 2016), kouření, drogy (Vazquez et al. 2001). Výskyt gastrointestinálních virových infekcí, např., jako rotavirové infekce, může zvyšovat riziko vzniku CD u DQ2 a/nebo DQ8 pozitivních malých dětí a u dospělých. Diskutována je také úloha střevní mikroflóry, neboť byla pozorována asociace mezi konkrétními skupinami bakterií a výskytů CD u dětí (Garnier-Lengliné 2015). Nicméně za formování slizničních lézí u pacientů s celiakií jsou odpovědné především peptidy lepku. Do tohoto procesu jsou peptidy lepku zapojeny různým způsobem: některé fragmenty jsou „imunogenní“ (např. p57-73) a vyvolávají adaptivní imunitní odpověď, jiné jsou „toxické“ (p31-43) a podílejí se na aktivaci vrozené imunitní odpovědi. Není však vyloučeno, že stejný peptid může mít obě schopnosti současně (Fraser et al. 2003).

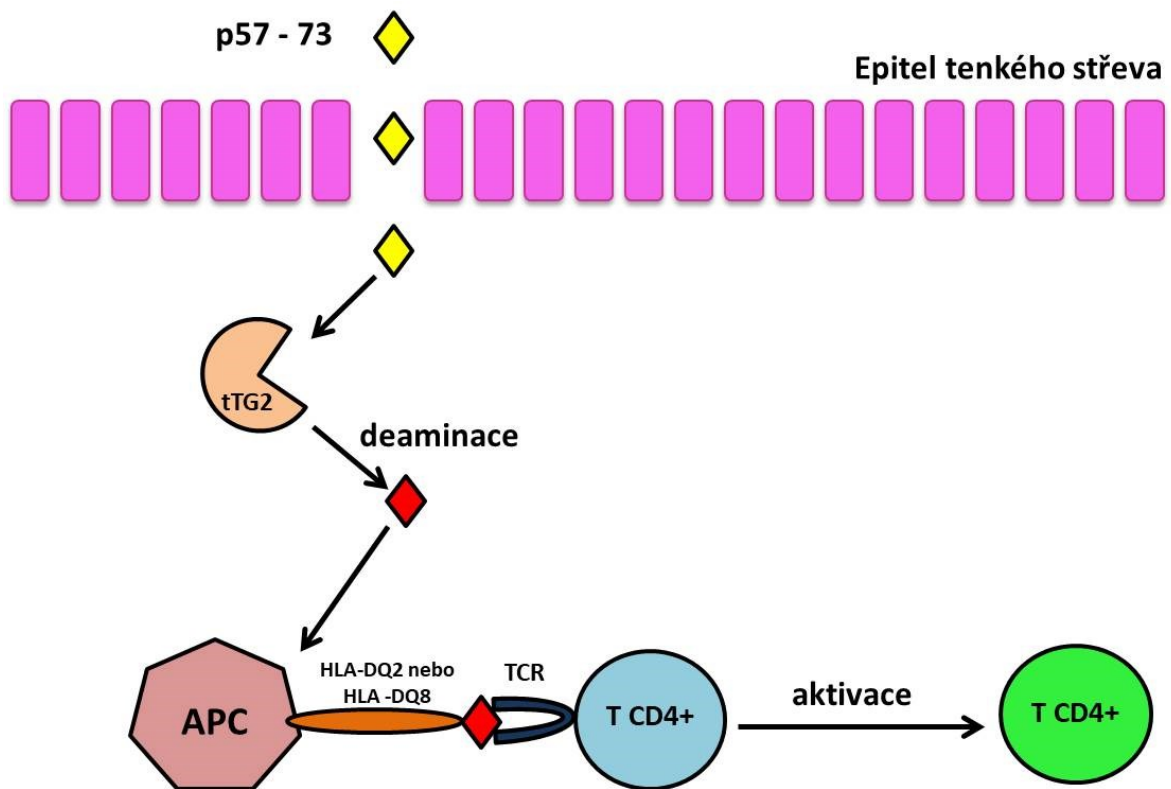
### 1.1.2 Imunologické faktory

Existují dva mechanismy vzniku celiakie - adaptivní imunitní reakce a vrozená imunitní reakce (Jabri et al. 2005). Dříve u celiakie nebyl sledován rozdíl mezi těmito dvěma typy imunitní reakce na lepek, avšak nyní se již ví o určitých dlišnostech ve spouštěcích mechanismech (viz výše). Peptidy lepku, které jsou definovány jako toxické, jsou schopné indukovat poškození sliznice tenkého střeva při podávání *in vivo*, zatímco ty, které jsou definovány jako imunogenní, jsou schopné specificky stimulovat HLA-DQ2- nebo DQ8- pozitivní klonů T lymfocytů (Ciccocioppo et al. 2005).

Takovýmto způsobem jsou peptidy lepku schopné vyvolat dvě imunologické dráhy: jedna je považována za rychlý účinek na epitel, který zahrnuje vrozenou imunitní odpověď, a druhá představuje adaptivní imunitní odpověď zahrnující CD4+ T lymfocyty v *lamina propria*, které rozpoznávají glutenové epitopy zpracované a prezentované buňkami prezentujícími antigen (Ciccocioppo et al. 2005).

#### **Adaptivní imunitní odpověď**

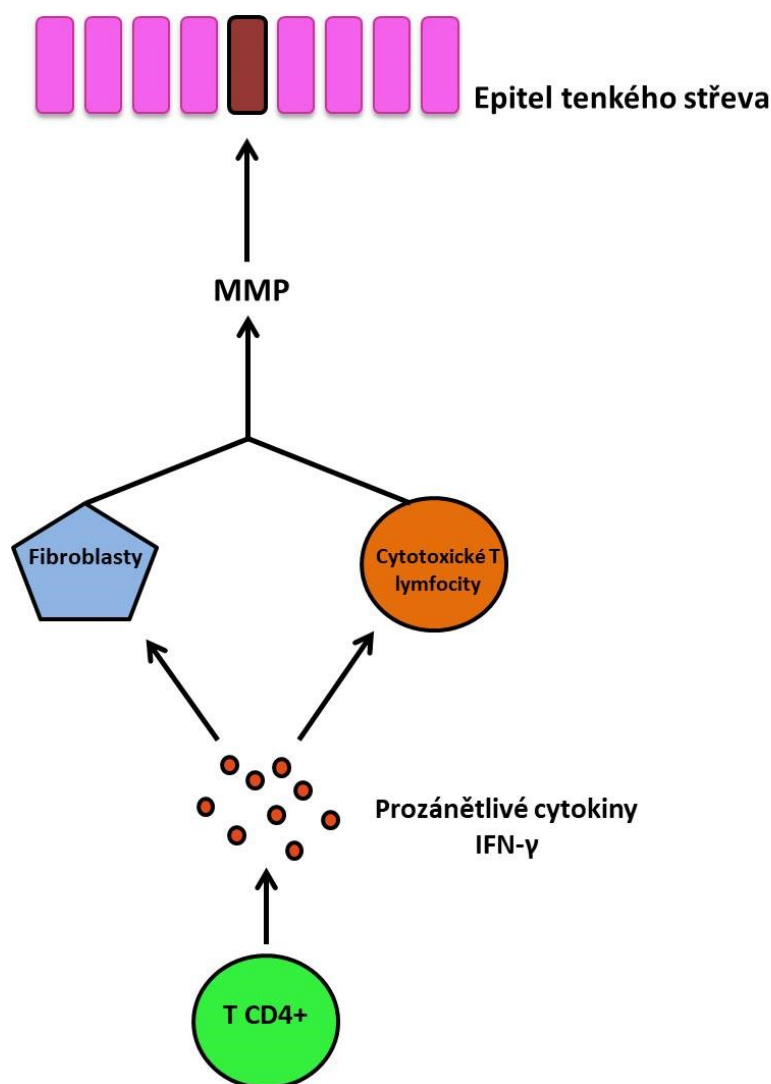
Imunogenní peptid prochází přes stěnu tenkého střeva a po průchodu je deaminován tkáňovou transglutaminázou. Pak se peptid váže na molekuly HLA-DQ2 a -DQ8 na antigen prezentující buňkách (APC). Tyto molekuly s deaminovanými peptidy aktivují CD4+ T lymfocyty (Obr. 3).



**Obr. 3:** Spuštění adaptivní imunitní odpovědi „imunogenním“ peptidem lepku

*(Upraveno podle: Stammaes and Sollid 2015)*

Aktivované CD4<sup>+</sup> T lymfocyty spouští expresi prozánětlivých cytokinů (např. IFN- $\gamma$  a IL-21) (Kagnoff 2007; Sollid et al. 2015; Hardy et al. 2016). Prozánětlivé cytokiny stimulují CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a fibroblasty k produkci toxických matrixových metaloproteináz (MMP), které jsou zodpovědné za degradaci extracelulární matrix a bazální membrány (Obr. 4) (Ciccocioppo et al. 2005). Aktivované T lymfocyty jsou také schopny vyvolat apoptózu enterocytů tím, že produkují molekuly jako Fas ligand a granzym, které jsou zodpovědné za cytotoxicitu, což vede k charakteristickým mukózním lézím. Stimulované CD4<sup>+</sup> T lymfocyty jsou také schopny indukovat diferenciaci lymfocytů B do plazmatických buněk produkujících specifické antigladinové a anti-tTG protilátky (Ciccocioppo et al. 2005).

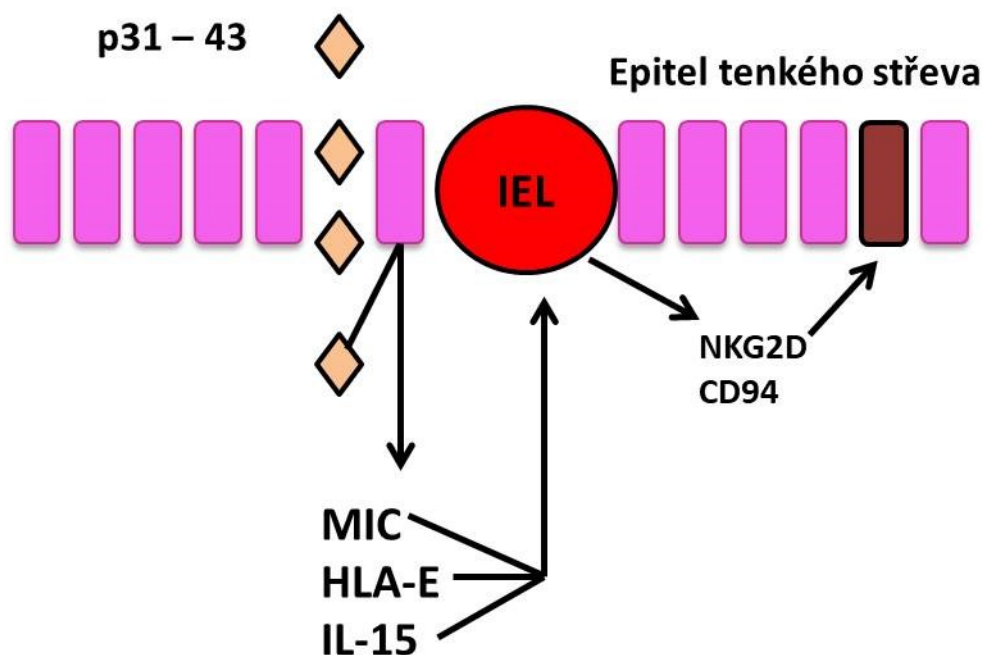


**Obr. 4** Atrofie klků vyvolaná matrixovými metaloproteinázami (MMP)

*(Upraveno podle: Ciccocioppo et al. 2005; Stammaes and Sollid 2015)*

### Vrozená imunitní odpověď

U stresovaných epitelových buněk v tenkém střevě toxický peptid indukuje expresi neklasických HLA molekul I. třídy, MIC a HLA-E, a interleukinu 15. Molekuly jako MIC a HLA-E jsou ligandy pro aktivaci receptorů NKG2D (NK lymfocyty aktivující receptor typu 2D) a CD94 (diferenciační antigen 94), které jsou pod vlivem IL-15 vysoce exprimovány na intraepiteliálních lymfocytech (IEL) při aktivní nemoci. Pouze intestinální enterocyty exprimující IL-15 a ligandy pro aktivaci NK receptorů budou likvidovány (Jabri et al. 2005) (Obr. 5).



**Obr. 5:** Vrozená imunitní odpověď spuštěná toxickým peptidem lepku

(Upraveno podle: Ciccocioppo et al. 2005; Stammaes and Sollid 2015)

### 1.1.3 Genetické faktory

Přibližně 95 % pacientů jsou HLA-DQ2 nebo -DQ8 pozitivní (Plugis 2015), ale tyto varianty vysvětlují jen 40 % dědičnosti celiakie (Garnier-Lengliné 2015). Existuje vysoká shoda u monozygotických dvojčat (mezi 70 a 86 %) a HLA haplotyp DQ2/DQ8 je hlavní genetický faktor, který to popisuje. Samotná genetická predispozice však k projevu celiakie nedostačuje, přibližně 30-35 % europoidní populace má tyto alely, ale jenom u 2-5 % z nich se celiakie projeví (Leivers 2014). Zbývajících 65-70 % dědičnosti celiakie může být způsobeno více než 50 non-HLA geny (Plugis 2015). Stále probíhají různé studie s cílem odhalit další kandidátní geny celiakie. Dosud objevené rizikové genetické varianty jsou lokalizovány v genech zahrnujících *IL2*, *IL21*, *CCR3*, *IL12A*, *IL18RAP* a *SH2B3*. Společně tyto varianty vysvětlují pouze 3 až 4 % dědičnosti celiakie. Tyto nově objevené varianty připomínají, že i když existuje základní pochopení patogenetického mechanismu celiakie, mnoho dalších příčinných faktorů zůstává neobjevených (Harris 2012).

### 1.2 Cytokiny

Cytokiny jsou velká skupina proteinových mediátorů, která zahrnuje interleukiny (ILs), kolonie stimulující faktory (CSFs), interferony (IFNs), faktory nekrotizující nádory (TNFs) a růstové faktory. Jsou vyráběny mnoha buňkami, včetně buněk imunitních, tukovou tkání,



žirnými buňkami, fibroblasty, endotelovými buňkami a keratinocyty. Jejich společným rysem je jejich pleiotropie, tj. vícesměrná aktivita. Mohou působit na buňky, které je vylučují (autokrinní působení), na sousední buňky (parakrinní aktivita) nebo na buňky lokalizované v různých orgánech (endokrinní aktivita). Představují antagonistickou, synergickou nebo komplexní aktivitu v závislosti na typu cílové buňky (MacRae et al. 2006). Cytokiny jsou mimo jiné regulátory hematopoetických buněk prostřednictvím jejich vlivu na přežití, proliferaci, diferenciaci a homeostázu lymfoidních buněk. Hrají důležitou roli v iniciaci a regulaci imunologické reakce a zánětu (Pagani et al. 2005). Cytokiny působí na cílové buňky přes specifické membránové receptory. Vazba na receptory aktivuje JAK/STAT signální dráhu, NFκB signální dráhu (Matta et al. 2017; Yu-Lee 2002) a jiné.

### **1.2.1 Klíčové cytokiny v patogenezi celiakie**

Cytokiny hrají jednu z hlavních úloh při zvýšení a kontrole rozvíjející se imunitní odpovědi prostřednictvím regulačního vlivu na T lymfocyty, monocyty, makrofágy a další imunitní buňky. T lymfocyty a monocyty/makrofágy jsou považovány za hlavní buňky, které se podílejí na intestinální enteropatii (Lionetti et al. 1993).

Prozánětlivé cytokiny jsou klíčové k regulaci jak adaptivní, tak i vrozené imunitní odpovědi v patogenezi celiakie: IL-15 dominuje u vrozené odpovědi, zatímco INF- $\gamma$  spolu s faktorem nekrózy nádorů  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a s IL-2, IL-4 a IL-12 řídí adaptivní odpověď (Meresse et al. 2012; Nilsen et al. 1998; Forsberg et al. 2002). U recentních pacientů s CD jsou detekovatelné zvýšené hladiny i dalších cytokinů – IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6. Tyto cytokiny jsou zvýšeny nejen ve střevní mukose, ale i na periférii v krevním séru (Kapur et al. 2004; Lahat et al. 1999). Odhalování nových cytokinů a porozumění jejich zapojení do vzniku CD může tedy vést k identifikaci terapeutických cílů (Lahat et al. 1999).

### **1.2.2 Signální dráhy cytokinů**

Zánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6 mají schopnost zvětšovat expresi IRF1 přes JAK/STAT signální dráhu a NFκB (Matta et al. 2017; Yu-Lee 2002).

JAK/STAT signální dráha je jednou z mála pleiotropních kaskád používaných k transdukcí velkého množství signálů pro vývoj a homeostázu u lidí. JAK/STAT signální dráha je hlavním signalizačním mechanismem pro širokou řadu cytokinů a růstových faktorů. Aktivace JAK stimuluje proliferaci buněk, diferenciaci, migraci buněk a apoptózu. U člověka se rodina JAK skládá ze čtyř členů: JAK1, JAK2, JAK 3 a TYK2 (Rawlings et al. 2004). Pro katalytickou aktivitu JAK jsou nutné tři substráty: buněčný povrchový receptor cytokinu (např. IL-6R) či růstového faktoru, STAT a JAK samotný (Clevenger et al. 2001). Mechanismus JAK/STAT a

NFκB signálních drah bude popsán v následujících kapitolách na příkladu cytokinů IFN-γ, TNF-α, IL-6, které byly vybrány pro naše experimenty.

### 1.2.3 Interferon-γ (IFN-γ)

IFN-γ je jediný člen rodiny IFN typu II a je sekretován aktivovanými imunitními buňkami – primárně T a NK lymfocyty, ale také B lymfocyty, NKT lymfocyty a profesionálními APC (Schroder et al. 2002). IFN-γ je kódován genem lokalizovaným u člověka na dlouhém raménku chromozómu 12 (Samuel 2001). Biologické účinky IFN-γ jsou vyvolány aktivací intracelulárních sítí pro molekulární signalizaci, z nichž nejlépe charakterizována je dráha JAK/STAT1. Obvyklá signalizace IFN-γ započíná vazbou IFN-γ na jeho buněčné povrchové receptory IFNγR1 a IFNγR2, což vede k oligomeraci receptoru a k aktivaci JAK/STAT1 signální dráhy (Briscoe et al. 1996).

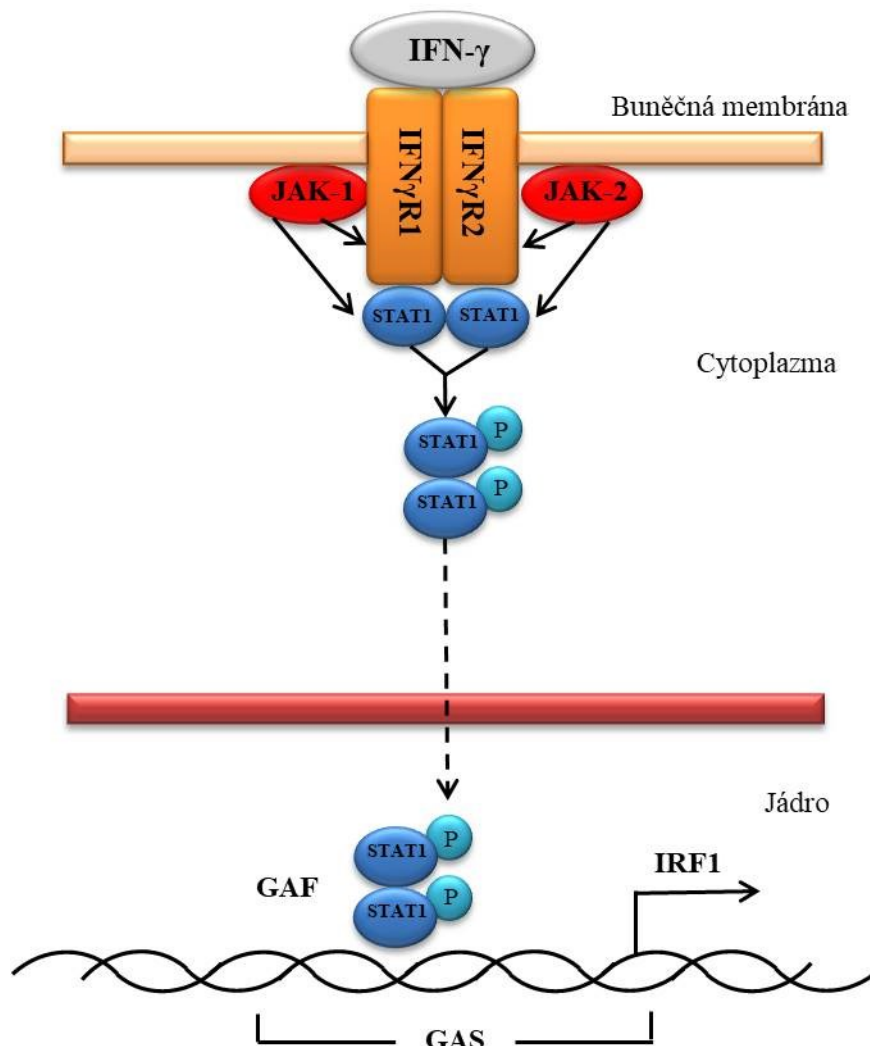
IFN-γ je pleiotropní cytokin, přičemž současné důkazy naznačují, že signalizace pomocí IFN-γ může výrazně modulovat expresi až 2339 lidských genů (Rusinova et al. 2013), z nichž mnohé jsou cíle sdílené s interferony typu I. Životní důležitost IFN-γ pro normální homeostázu a imunitu je doložena zvýšenou citlivostí na infekce u pacientů s nedostatečností signalizací IFN-γ. Tyto nedostatky vedou k náchylnosti k infekcím způsobeným různými patogeny, zejména mykobakteriálními a kvasinkovými (Vilella et al. 2001; Dupuis et al. 2000; Smith et al. 2014).

IFN-γ zprostředkovává zastavení růstu ve většině typů buněk, ale robustně indukuje proliferaci v Th1 lymfocytech (Landolfo et al. 1988). Nicméně IFN-γ může indukovat apoptózu v Th1 lymfocytech po aktivaci TCR-zprostředkovaných signálů (Liu and Janeway 1990). Tyto odlišné reakce byly přičítány síle signálu v důsledku rozdílů v hladinách exprese IFNγR2 (Pernis et al. 1995).

### JAK/STAT a IFN-γ

Signál IFN-γ zahrnuje heterodimerizaci dvou podjednotek IFNγR buněčných povrchových receptorů a následnou aktivaci dvou členů Janus tyrozin kináz, JAK1 a JAK2 (Mogensen et al. 1999; Schindler 1999). JAK1 interaguje s podjednotkou receptoru IFNγR-1 a JAK2 s podjednotkou IFNγR-2. Aktivace JAK kináz vede k fosforylaci STAT1, latentního cytoplazmatického transkripčního faktoru rodiny proteinů STAT (signální senzor a aktivátor transkripce) (Bach et al. 1997; Schindler 1999). STAT1, když je fosforylován v reakci na aktivaci JAK1 a JAK2, následně tvoří homodimery GAF (gamma aktivační faktor). Po translokaci do jádra se STAT1 homodimer váže na reakční prvek GAS (gama aktivační místo) přítomný v reaktivních promotorech vázán přímo na STAT1 homodimer, což vede k transkripční

aktivaci např. IRF1. Kromě STAT1 homodimerů aktivovaných signalizací IFN- $\gamma$  se k těmto elementům GAS váží i další STAT proteiny aktivované jinými cytokiny (Schindler 1999; Darnel 1997; Boehm et al. 1997).



**Obr. 6:** Aktivace JAK/STAT signální dráhy IFN- $\gamma$  vedoucí k expresi IRF1

(Upraveno podle: Shtrichman and Samuel 2001)

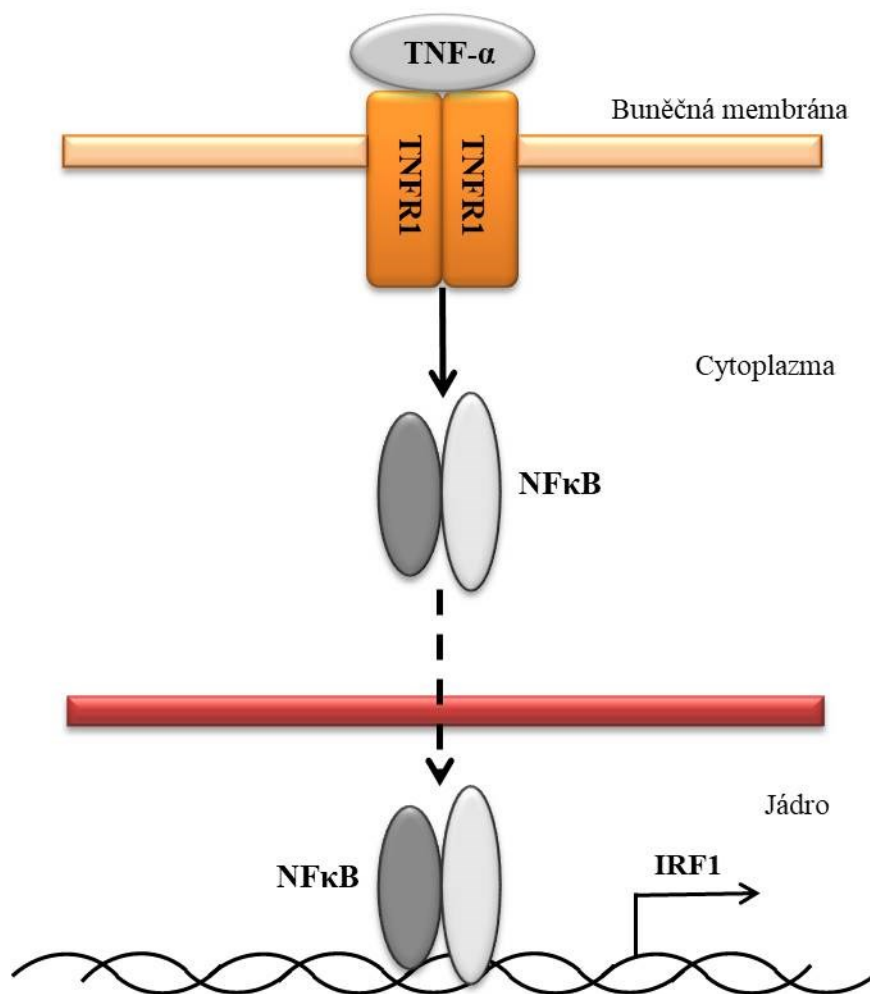
#### 1.2.4 TNF- $\alpha$

Faktor nekrózy nádorů (TNF- $\alpha$ ) je glykoprotein, který se skládá ze 157 aminokyselin. TNF- $\alpha$  je sekretován aktivovanými monocyty a makrofágy a v menší míře adipocyty, keratinocyty, fibroblasty, neutrofilů, endotelovými buňkami, žírnými buňkami a některými lymfocyty. Nejsilnějším stimulem pro produkci TNF jsou lipopolysacharidy (LPS) bakteriálních buněčných stěn. TNF- $\alpha$  působí prostřednictvím receptorů (TNFR1 a TNFR2), které jsou přítomny na povrchu téměř všech jaderných buněk. Aktivita TNF- $\alpha$  je vícesměrná. Jedná se o jeden z hlavních cytokinů zánětlivé odpovědi. TNF- $\alpha$  aktivuje transkripční faktor NF $\kappa$ B, který iniciuje tvorbu prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- $\alpha$  (Shoelson et al. 2007). Prudká sekrece značného množství TNF vede k příznakům šoku, ke zvýšení sekrece katabolických hormonů a k

akutní multiorgánové insuficienci. Chronická sekrece malých množství TNF způsobuje úbytek hmotnosti, anorexii, katabolismus proteinů a lipidů, zánětlivé změny vnitřních stěn tepen, které vedou k aterosklerotickým změnám. TNF- $\alpha$  zvyšuje inzulinovou rezistenci v periferních tkáních (Ziora et al. 2013). Je známo, že vysoká koncentrace TNF- $\alpha$  u chronických onemocnění zhoršuje růstové procesy (Gaspari et al. 2011; Zhao et al. 2014). Zdá se, že TNF- $\alpha$  snižuje koncentraci IGF-1 (inzulinový růstový faktor 1) v důsledku snížení exprese receptorů pro růstový hormon v játrech (Wong et al. 2006). Způsobuje rezistenci na IGF-1 v růstové ploténce která omezuje proces diferenciací chondrocytů a urychluje jejich apoptózu (Choukair et al. 2014).

### **JAK/STAT a NF $\kappa$ B signální dráhy a TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  aktivuje kinázy JAK1 a TYK2. Tato aktivace je doprovázena fosforylací tyrosinu STAT3 a STAT5b a jejich translokací do jádra, což ukazuje, že v buňkách mohou dodatečné prvky řídit transkripční mechanismus vyvolaný TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  může aktivovat JAK/STAT signální dráhu, ale důležitější signální dráha pro aktivaci IRF1 je přes NF $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B) (viz Obr. 7) (Kröger et al. 2002).



**Obr. 7** Aktivace NFκB signální dráhy TNF-α vedoucí k expresi IRF1

*(Upraveno podle: Kröger et al. 2002)*

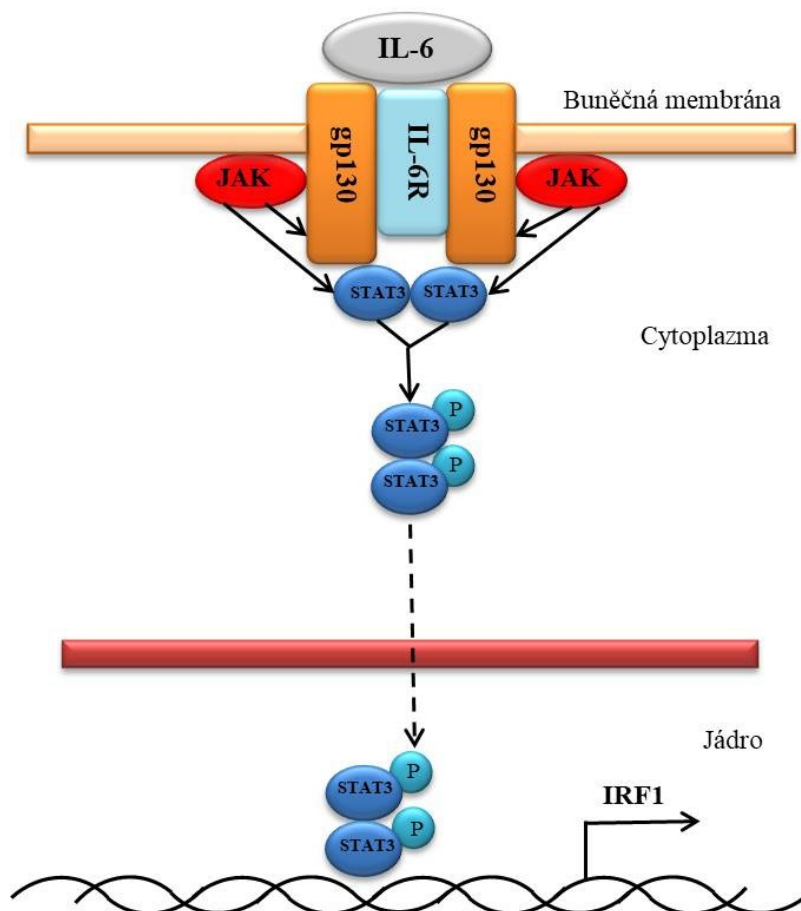
### 1.2.5 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 je také známý jako interferon β2, faktor stimulující lymfocyty B nebo diferenciací faktor lymfocytů B (Ziora et al. 2013; Akdis et al. 2011). Vyrábí se hlavně monocyty a makrofágy, ale také lymfocyty T a B, fibroblasty, endotelem a adipocyty (Ziora et al. 2013). Asi 15-30 % cirkulujícího IL-6 je vylučováno adipózní tkání (Ziora et al. 2013). Hlavním faktorem, který stimuluje sekreci IL-6, je IL-1, ale také interferony, TNF, LPS a viry. IL-6 působí prostřednictvím svého receptoru (IL-6R), který má aktivitu tyrosinkinázy a je přítomen v buněčné membráně stejně jako v rozpustné formě (Ziora et al. 2013; Rawstron et al. 2000). Exprese receptoru IL-6 je prezentována monocyty, makrofágy, aktivovanými T a B lymfocyty a endotelovými buňkami (Akdis et al. 2011; Spangelo et al. 1995). IL-6 se podílí na regulaci imunologické odpovědi a na její iniciaci stejně jako na udržování zánětlivé reakce (aktivací zpětnovazební smyčky IL-1 a TNF-α) (Ziora et al. 2013; Akdis et al. 2011; Dubiński and Zdrojewicz 2007). Zvýšená hladina IL-6 v krevním séru je považována za marker chronického

zánětlivého procesu (Choi et al. 2007). Zvýšená koncentrace IL-6 v krvi je pozorována u dětí s poruchami růstu způsobenými zánětlivými onemocněními střev (MacRae et al. 2006). Na úrovni růstové chrupavky zvyšuje IL-6 osteoklastogenezi a snižuje aktivitu osteoblastů (Gaspari et al. 2011). Zatímco popisují prozánětlivý účinek IL-6, musí být zmíněny také jeho protizánětlivé charakteristiky. IL-6 inhibuje sekreci TNF a IL-1 (MacRae et al. 2006).

### JAK/STAT a IL-6

Cytokiny typu IL-6 využívají tyrosin kinázy rodiny JAK a transkripční faktory STAT jako hlavní mediátory signální transdukce, což je rys, který sdílí s interferony a mnoha dalšími cytokiny a růstovými faktory (Lütticken et al. 1994; Stahl et al. 1994; Darnell et al. 1994). Následně se STAT stávají fosforylovanými, vytvářejí dimery a přemísťují se do jádra, kde regulují transkripci cílových genů (Stahl et al. 1995). K aktivaci exprese IRF1 vede dráha JAK/STAT3 (viz Obr. 8).



**Obr. 8:** Aktivace JAK/STAT signální dráhy IL-6 vedoucí k expresi IRF1  
gp130 – glykoprotein130

(Upraveno podle: Heinrich et al. 1998; Heinrich et al. 2003)

### 1.3 Interferon regulující faktor 1 (IRF1)

Interferon regulující faktory (IRFs) jsou rodina transkripčních faktorů, které byly nejprve identifikovány jako regulátory genové exprese interferonu typu I (IFN- $\alpha$  a  $\beta$ ) indukované virem (Ning 2014). S pozdějším objevem dalších rodin IFN (typ II a III) bylo pozorováno, že většina IRF byla zapojena do jejich regulace (Honda et al. 2006).

IRF1 je protein, který se skládá z 325 aminokyselin a je kódován genem *IRF1*. Tento gen je lokalizován na chromosomu 5q23.3 (Palladinetti et al. 2008).

Hladiny IRF1 jsou výrazně regulovány na úrovni transkripce v reakci na různé podněty, jako jsou IFNs (typ I a typ II), dvojvláknová RNA, cytokiny a hormony (Miyamoto et al. 1988). IRF1 reguluje transkripci souboru cílových genů, které hrají základní roli v různých fyziologických a patologických procesech včetně virové infekce, imunitní odpovědi proti nádorům, prozánětlivého poškození, rozvoje imunitního systému (Dou et al. 2014).

Kromě funkce IRF1 v regulaci exprese různých genů, jejichž produkty jsou základem pro imunologickou odpověď, odhalily předchozí studie roli IRF1 ve vývoji různých imunitních buněk, včetně NK lymfocytů, zralých CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a diferenciaci Th1 lymfocytů (Trinchieri 1989). Koordinovaná aktivace a diferenciaci různých typů imunitních buněk přispívají k účinné imunitní odpovědi; nepřekvapí tak, že abnormality IRF1-zprostředkované regulace těchto procesů jsou základem patogeneze mnoha autoimunitních poruch. Ukázalo se, že IRF1 hraje důležitou roli v patogenezi roztroušené sklerózy a experimentální autoimunitní encefalitidy, včetně oligodendrocytového poškození a zánětlivé demyelinizace (Loda et al. 2012). Giannouli et al. (2014) také zjistili, že nepřítomnost transkriptu faktoru IRF1 zřejmě chrání před rozvojem autoimunity u myelodysplázie. Tyto důkazy naznačují potenciální terapeutickou hodnotu IRF1 při autoimunitních onemocnění (Dou et al. 2014).

#### 1.3.1 Vztah IRF1 a celiakie

Vzhledem k silné a pluripotentní roli IRF1 v imunitní odpovědi je tento faktor dalším potenciálním hráčem v patogenezi celiakie. IRF1 je indukován několika exogenními a endogenními faktory včetně cytokinů (např. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6), a naopak aktivuje velké množství genů. Zvláště je důležité pro CD, že IRF1 je silný induktor IFN- $\alpha$ , který je zase schopen stimulovat zesílené Th1 odpovědi (Monteleone et al. 2001). Proto je možné předpokládat, že IRF1 hraje důležitou roli ve vývoji imunitní odpovědi Th1 u CD, jak je dokumentováno u jiných Th1-zprostředkovaných imunitních onemocnění, např. u diabetu melitus (Suk et al. 2001; Salvati et al. 2003).

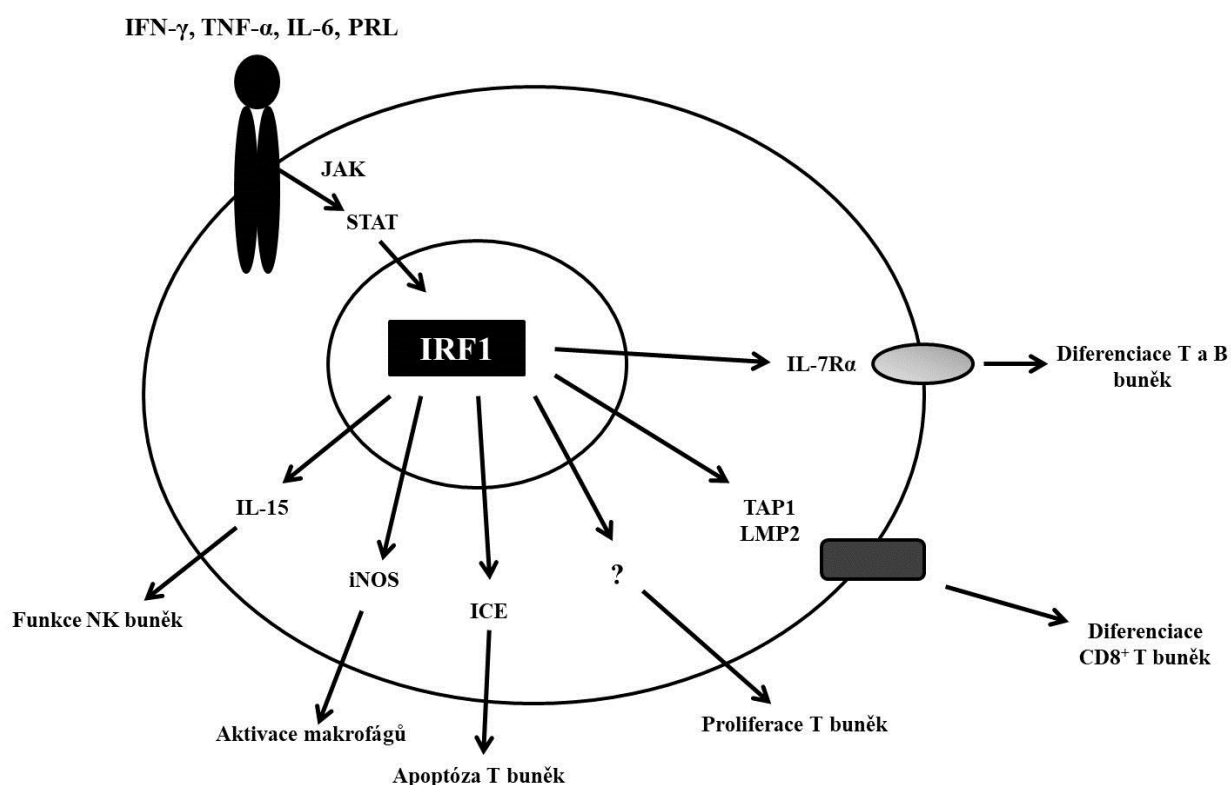
V různých studiích byla sledována exprese IRF1 v mukose tenkého střeva a vždy byla zvýšená (Farber 1992; Lahdenperä et al. 2017). V práci Brynychové et al. (2016) bylo ukázáno,

že exprese markerů (IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR4), jež jsou v literatuře popisovány jako upregulované ve střevní mukose pacientů s aktivní formou celiakie, je zvýšená i u monocytů periferní krve (PBM). Díky auto- a parakrinnímu působení se tedy PBM recentních pacientů s CD nacházejí v přítomnosti zvýšených hladin cytokinů, které mají schopnost aktivovat expresi IRF1 (Matta et al. 2017).

V současné době kompletní obraz o vlivu IRF1 na buňky monocyto-makrofágové linie dodnes chybí, a proto je třeba zjistit, jak tento faktor ovlivňuje monocyty a jak je spojen s celiakií. Možná by to pomohlo při dalším studiu této choroby, její diagnózy a léčby.

### 1.3.2 Vliv IRF1 na imunitní buňky

IRF1 hraje roli ve vývoji různých imunitních buněk včetně NK lymfocytů, zralých CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a Th1 lymfocytů (Trinchieri 1989). IRF1 reguluje expresi řady genů důležitých pro zprostředkování imunitní odpovědi, obrany hostitele, progresu buněčného cyklu, suprese nádoru a apoptózy (viz Obr. 9) (Bole-Feysot et al. 2000).



**Obr. 9:** Význam multifunkčního transkripčního faktoru IRF1 v buněčných procesech

(Upraveno podle: Yu-Lee 2001)



## **Apoptóza**

Obecně aktivita IRF1 nevede ke smrti buněk, při určitých fyziologických a patologických stavech však podporuje apoptózu. Jedním ze způsobů, jak zabránit tvorbě transformovaných buněk v organismu po poškození DNA, je aktivace sebevražedného programu. Apoptóza mitogenem aktivovaných T lymfocytů vyvolaná poškozením DNA závisí na IRF1 (Tamura et al. 1995). Aktivované T lymfocyty podléhají apoptóze po expresi Fas ligandu (FasL) a jeho navázání na receptor Fas (CD95) (Krammer et al. 1994). Systém Fas/FasL je navíc prostředkem, kterým cytotoxické T lymfocyty (CTL) indukují apoptózu v cílových buňkách. Delece a mutagenese vazebného místa IRF1 v promotoru FasL, nucená exprese IRF1 a downregulace aktivity IRF1 pomocí antisense RNA prokázaly, že exprese FasL v aktivovaných T lymfocytech je řízena IRF1 (Chow et al. 2000). IRF1 tedy nejen představuje bariéru proti nekontrolované expanzi aktivovaných T lymfocytů, ale také se podílí na kontrole mechanismu, který T lymfocyty používají k indukci apoptózy ve svých cílových buňkách (Chow et al. 2000; Kano et al. 1999).

Kromě toho může IRF1 působit jako prostředník apoptózy indukované cytokiny: IFN- $\gamma$  způsobuje apoptózu u primárně kultivovaných hepatocytů, což možná odráží jeden z mechanismů, které se podílejí na patogenezi imunitně zprostředkované hepatitidy. Hepatocyty z IRF1-deficientních myši jsou zcela rezistentní vůči indukci apoptózy IFN- $\gamma$  (Kano et al. 1999).

## **Protizánětlivá odpověď**

IRF1 reguluje expresi iNOS v makrofázích (Kamijo et al. 1994). iNOS katalyzuje reakci krátkodobého těkavého plynu NO, který je jedním z hlavních mechanismů makrofágové cytotoxicity proti nádorovým buňkám, bakteriím, prvokům, helmithům a houbám (Nathan and Hibbs 1991). iNOS genová transkripce je indukována jak IFN- $\gamma$ , tak LPS (Ding et al. 1991). V promotoru genu *iNOS* byla identifikována vazebná místa pro IRF1 a IRF1 je nezbytný pro indukci iNOS (Kamijo et al. 1994), což ukazuje, že IRF1 se podílí na antibakteriální odpovědi. Nadměrná exprese IRF1 indukuje transkripci IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . Vedle účasti na antivirových procesech mají IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  řadu dalších imunostimulačních účinků na makrofágy a T buňky (Bogdan 2000).

Jako typické protizánětlivé cytokiny jsou považovány IL-10, IL-4 a TGF- $\beta$ , u monocyto-makrofágové populace buněk je považován za silně protizánětlivý CD163 (Madsen et al. 2004). Vybrané protizánětlivé markery budou podrobněji popsány níže.

## 1.4 Vybrané markery stanovující vliv IRF1 na monocyty

Pro pochopení, zda a jaký vliv má IRF1 na monocyty, lze studovat expresi povrchových molekul monocytů nebo cytokinů/chemokinů monocytů produkovaných, které reprezentují jeden ze tří výše nastíněných osudů: apoptózu, protizánětlivou odpověď nebo diferenciaci v makrofágy či dendritické buňky.

### 1.4.1 CD163

CD163 je glykoproteinový receptor na buňkách, který je vysoce exprimován na většině podskupin rezidentních tkáňových makrofágů (Fabriek et al. 2005). Tato molekula je členem scavenger receptor cystein-rich (SRCR) třídy B (Law et al. 1993; Hogger et al. 1998) a byla identifikována jako endocytický receptor pro hemoglobin-haptoglobin (Hb-Hp) (Kristiansen et al. 2001). Dále je CD163 exprimován na rezidentních makrofázích kostní dřeně a dalších makrofázích, které se podílejí na tvorbě erytroblastických ostrovů (Fabriek et al. 2007). Kromě těchto homeostatických funkcí cross-linking CD163 s monoklonálními protilátkami namířenými proti CD163 vyvolává produkci zánětlivých mediátorů, jako je oxid dusnatý, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-10, což naznačuje potenciální roli v obraně imunitních a/nebo hostitelských buněk (Van Den Heuvel et al. 1999; Ritter et al. 2001; Polfliet et al. 2006).

Exprese CD163 může být regulována řadou faktorů, které byly intenzivně studovány *in vitro*. V souladu s expresí na maturovaných makrofázích *in vivo*, *in vitro* diferenciaci monocytů v makrofágy silně indukuje expresi CD163 mRNA a proteinu. Po *in vitro* léčbě monocytů glukokortikoidy bylo zjištěno, že procento CD163 pozitivních monocytů stoupá z 10-30 % na 90 % (Wenzel et al. 1996). Když se *in vivo* podávají glukokortikoidy dobrovolníkům, populace CD163 pozitivních monocytů je více než 80% během 6 hodin (Zwadlo-Klarwasser et al. 1990). Je zajímavé, že jiné protizánětlivé mediátory, jako jsou IL-10 a IL-6, také podporují expresi CD163 (Buechler et al. 2000; Sulahian et al. 2000). Naopak, prozánětlivé mediátory jako jsou LPS, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , potlačují tvorbu CD163 (Buechler et al. 2000).

Pokud jsou monocyty diferencovány v dendritické buňky (GM-CSF a IL-4), hladiny CD163 mRNA a proteinu jsou potlačeny (Buechler et al. 2000), ačkoliv Sulahian et al. (2000) ukazují, že dendritické buňky odvozené od monocytů mohou ještě exprimovat nízké hladiny CD163. Když jsou monocyty stimulovány ke „klasickému“ nebo „alternativnímu“ fenotypu IFN- $\gamma$  a LPS nebo IL-4 a IL-13, obzvláště vysoká exprese CD163 je pozorována u „alternativně aktivovaných“ makrofágů, které hrají hlavní roli při tlumení zánětlivé reakce a v odklizení poškozených buněk (Gordon 2003).

Regulace CD163 prozánětlivými a protizánětlivými mediátory naznačuje vazbu mezi potlačením imunitního systému CD163 a rozlišením zánětu. Fakt, že CD163 je exprimován ve

vysokých hladinách ve většině podskupin zralých tkáňových makrofágů, poukazuje na roli CD163 při rozpoznávání patogenů a následné vrozené imunitní odpovědi (Fabriek et al. 2005).

#### 1.4.2 CD95 (Fas)

Fas (CD95, APO-1) je obecně považován za prototypový receptor buněčné smrti nadrodiny TNFR, který iniciuje apoptózu po zachycení Fas ligandu (FasL, CD95 ligand) (Nagata 1994; Nagata and Golstein 1995; Wallach et al. 1999). Převládající představa byla, že Fas-indukovaná apoptóza funguje jako nezánětlivá cesta k eliminaci efektivních buněk, zvláště při regulaci a řešení imunitních a zánětlivých reakcí (Krammer 2000; Haslett et al. 1994; Haslett 1999; Savill 2000). Kontrola exprese CD95 je klíčovým faktorem pro regulaci apoptózy v několika buněčných systémech. Přestože různé regulační faktory, jako jsou p53, SP1, NFkB a AP-1, se podílejí na regulaci promotoru CD95 v různých buněčných kontextech (Chan et al. 1999; Owen-Schaub et al. 1995; Li et al. 1999), molekulární události regulující konstitutivní a indukovatelnou expresi genu CD95 nebyly zatím zcela objasněny. IFN- $\gamma$  zvyšuje expresi CD95 a CD95-indukovanou apoptózu u několika typů buněk (Ossina et al. 1997). Lidské monocyty a makrofágy pocházející z monocytů exprimují Fas, ale jsou odlišně citlivé na apoptózu indukovanou Fas (Kiener et al. 1997; Perera and Waldmann 1998; Perlman et al. 1999).

#### 1.4.3 IL-10

Interleukin-10 (IL-10) je cytokin s protizánětlivými vlastnostmi, má ústřední úlohu v infekci tím, že omezuje imunitní odpověď na patogeny a tím zabraňuje poškození hostitele. V poslední době je velký zájem o informace, jak je exprese IL-10 regulována v různých imunitních buňkách. Pochopení specifických molekulárních událostí, které regulují tvorbu IL-10, pomůže odpovědět na zbývající otázky, které jsou důležité pro návrh nových strategií imunitní intervence (Saraiva and O'Garra 2010).

IL-10 je exprimován mnoha buňkami adaptivního imunitního systému včetně podskupin buněk Th1, Th2 a Th17 (Moore et al. 2001), CD8+ T buněk a B buněk (Maynard and Weaver 2008; Maloy and Powrie 2001). Je také exprimován buňkami vrozeného imunitního systému, včetně dendritických buněk, makrofágů, žírných buněk, NK lymfocytů, eozinofilů a neutrofilů (Moore et al. 2001). Proto se produkce IL-10 zdá být spojená s mnoha imunitními buňkami, potvrzující její rozhodující roli jako zpětnovazebný regulátor různorodých imunitních odpovědí (O'Garra and Vieira 2007; Trinchieri 2007).

Aktivace DC a makrofágů patogeny zahrnuje rozpoznávání produktů odvozených od patogenů pomocí receptorů rozpoznávajících vzory (PRR), které vyvolávají expresi cytokinů a dalších faktorů (Medzhitov 2007). Makrofágy a DCs mohou exprimovat IL-10 *in vitro* po

aktivaci specifických PRR (Boonstra et al. 2006; Edwards et al. 2002). Navíc DCs (Akbari et al. 2001), makrofágy a neutrofilny (Siewe et al. 2006; Zhang et al. 2009) vykazují expresi IL-10 *in vivo*. Je zajímavé, že aktivace makrofágů prostřednictvím TLRs vede k vysoké produkci IL-10, zatímco myeloidní DCs produkují pouze malé množství a plazmacytoidní DCs (pDCs) nevykazují detekovatelné hladiny IL-10. Navázání ligandu na CD40 zvyšuje produkci IL-10 pomocí stimulovaných TLRs nebo DCs stimulovaných dektinem 1 a ligace Fc receptorů (FcRs) zvyšuje produkci IL-10 pomocí TLR-stimulovaných makrofágů (Rogers et al. 2005; Edwards et al. 2002; Gerber and Mosser 2001).

## 1.5 Monocyty

Monocyty jsou definovány jako cirkulující krevní buňky, které tvoří přibližně 10 % periferních leukocytů. Krevní monocyty se vyvíjejí v kostní dřeni ze společného myeloidního progenitoru, který je sdílen s granulocyty. Monocyty se následně uvolňují do periferní cirkulace jako nedělicí buňky (van Furth et al. 1979). Poločas cirkulujícího monocyty je odhadován přibližně na 3 dny (van Furth and Cohn 1968; Liu et al. 2007). Tento krátký poločas nakonec utvořil představu, že krev působí jako obecný zásobník myeloidních prekurzorů, což umožňuje kontinuální repopulaci tkáňových makrofágů a zejména přechodných dendritických buněk (Serbina and Pamer 2006; Geissmann et al. 2003; Randolph et al. 1998).

Monocyty patří do mononukleárního fagocytárního systému (MPS), specializovaného systému fagocytárních buněk lokalizovaných v celém těle (van Furth et al. 1972; Auffray et al. 2009). Buňky tohoto systému se podílejí na vrozené imunitní odpovědi, podporují adaptivní imunitní odpověď a hrají roli při udržování tkáňové homeostázy. Monocyty jsou kritickou složkou MPS a jsou důležité u mnoha onemocnění se zánětlivou složkou jako jsou infekce, kardiovaskulární onemocnění, diabetes melitus I. typu a rakovina (Liu et al. 2009; Hettinger et al. 2013).

### 1.5.1 Typy monocytů

Dříve byly identifikovány dvě diskrétní subpopulace lidských krevních monocytů na základě morfologie a diferenciální exprese antigenních markerů CD16 a CD14 (Shen et al. 1983; Grage-Griebenow et al. 1993; Zembala et al. 1984; Ziegler-Heitbrock et al. 1991). Tyto údaje poskytly první stopy potenciální existence podskupin monocytů s odlišnými fyziologickými vlastnostmi (Grage-Griebenow et al. 2001; Tacke et al. 2007). CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> buňky byly nazvány „klasické“, protože jejich fenotyp se podobá původnímu popisu monocytů, což odpovídá 90 % lidských krevních monocytů; druhou skupinu tvoří méně časté „neklasické“ CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocyty (Passlick et al. 1989; Ziegler-Heitbrock et al. 1993). Lidské

monocyty navíc obsahují nepatrnou populaci CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> buněk, které byly nazvány „přechodné“. Tyto buňky se od „klasických“ a „neklasických“ v mnoha aspektech liší a diskriminace a funkce těchto populací je záležitostí intenzivního studia (Goff et al. 1996; Mirkovitch et al. 2006).

## 2 Předpoklady a cíle diplomové práce

Abychom rozšířili vědomosti o roli IRF1 v patogenezi celiakie, zaměřili jsme se v této studii na cirkulující monocyty a stanovení změn monocytární exprese IRF1 mRNA a následně markerů apoptózy (CD95) a protizánětlivé reakce (CD163 a IL-10). Na základě poznatků z jiných studií byly formulovány tyto předpoklady:

- Zánětlivé prostředí působí u monocytů zvýšení exprese IRF1 mRNA, přičemž u monocytů pocházejících od pacientů s celiakií bude tato změna exprese odlišná od změny u monocytů zdravých dárců.
- Zvýšená exprese IRF1 u monocytů buď ovlivní jejich diferenciaci, povede k apoptóze nebo protizánětlivé reakci.

Na základě předpokladů jsme definovali cíle diplomové práce:

- Pomocí metody kultivace a stimulace vybranými cytokiny (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) ověřit, zda zánětlivé prostředí vede ke zvýšené expresi IRF1 mRNA u monocytů zdravých lidí a pacientů s celiakií (recentních i dodržujících bezlepkovou dietu).
- Zjistit, jaký vliv má zvýšená exprese IRF1 na monocyty zdravých lidí a pacientů s celiakií dodržujících bezlepkovou dietu, konkrétně zda zvýšení IRF1 následně vede k apoptóze monocytů či protizánětlivé reakci nebo ovlivní následnou diferenciaci buněk.

### 3 Materiál a metody

Výchozím materiálem pro experimenty byla plná krev získaná od pacientů s celiakií (recentních a dodržujících bezlepkovou dietu) a od zdravých lidí, kteří představovali kontrolu. Metody zpracování této krve jsou rozděleny do úseků metod založených na kultivaci a stimulaci monocytů, získání a zpracování RNA, kvantitativní PCR (QPCR) se zaměřením na sledovaný výstup, který těmito metodami chceme zjistit.

Optimalizace designu tohoto postupu byla provedena na buňkách THP1.

#### 3.1 Pacienti

Vzorky krve pacientů s celiakií byly získávány na základě spolupráce s II. Interní klinikou Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze a IV. interní klinikou Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Do diplomové práce bylo zahrnuto 15 pacientů s celiakií, diagnostikovaných na základě kritérií ESPGHAN (Riordan and Davidson 1991) a Marsh kritérií (Marsh 1992). V hodnoceném souboru bylo 12 žen a 3 muži ve věku od 19 do 46 let a jednalo se jak o pacienty s nově diagnostikovanou (= aktivní formou) celiakie (označování jako pacienti s recentní celiakií/recentní pacienti, rCD), tak o pacienty s celiakií, kteří již drželi bezlepkovou dietu, a to déle než jeden rok (CD-GFD). Ke každému pacientovi byli vybráni zdraví dárči stejného pohlaví a věku (+/- 2 roky). Bylo tedy dbáno na to, aby byly vždy porovnávané skupiny co nejvíce odpovídající, především z důvodu změny reaktivity imunitního systému v průběhu života. Dále byli zdraví dárči bez autoimunitních nebo jiných chronických onemocnění a v době déle jak 14 dní bez infekčních či dalších onemocnění (HC, viz Tab. 1). Všichni dárči byli se studií seznámeni a podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena etickou komisí PŘF UK.

**Tab. 1** Sledovaný soubor pacientů

<b>Typ pacienta</b>	<b>Recentní pacienti (rCD)</b>	<b>Pacienti na dietě (CD-GFD)</b>	<b>Zdraví dárči (HC)</b>
<b>Počet</b>	5	10	10
<b>Věk – průměr (rozptyl) [roky]</b>	35,2 19 – 45	36,4 22 – 46	34,9 19 – 43
<b>Pohlaví</b>	4 ženy a 1 muž	8 žen a 2 muži	3 ženy a 3 muži

Každý vzorek dostal evidenční číslo SC20 – SC47 (stimulace cytokiny 20.–47. experiment) a pod tímto evidenčním číslem byl vzorek dále zpracováván jak v laboratoři, tak při statistickém hodnocení.



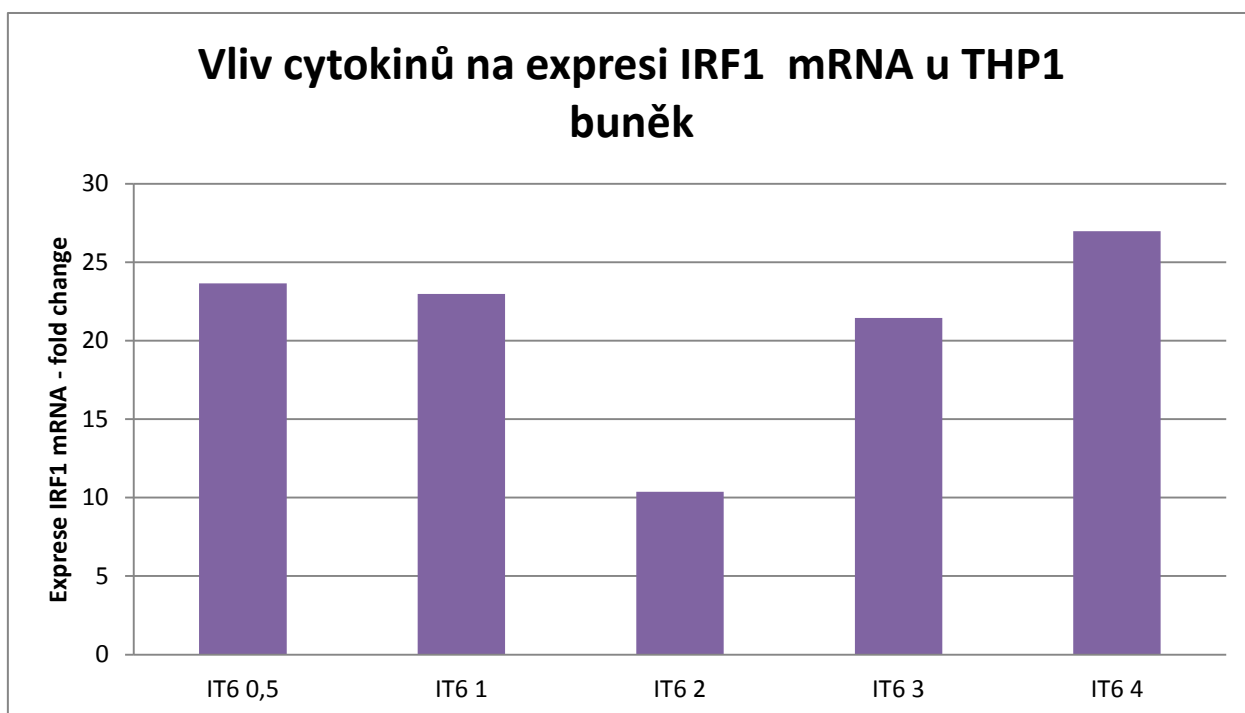
### **3.2 Optimalizace postupů pomocí buněčné linie THP1**

Optimalizace designu experimentů byla provedena na THP1 buňkách. THP1 je lidská monocytární linie, která byla získána od pacienta s akutní monocytární leukémií. Tyto buňky se používají především v imunocytochemických a imunohistochemických analýzách.

Pro naši laboratoř byly buňky THP1 získány darem. Buněčná linie THP1 byla pro nastavení experimentů zvolena z důvodu snadné dostupnosti velkého množství buněk (oproti limitovanému množství primárních monocytů z lidské periferní krve), které byly pro optimalizační experimenty potřebné.

#### **3.2.1 Optimalizace délky stimulace THP1 buněk cytokiny**

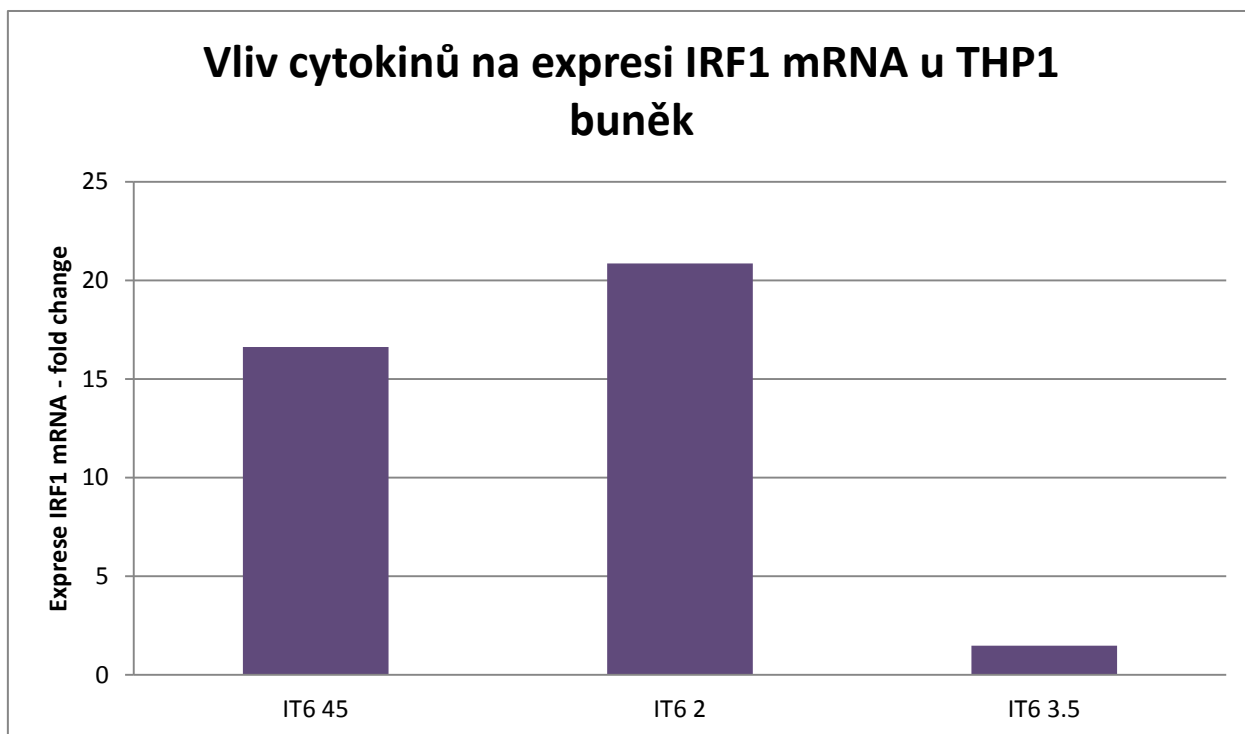
V rámci optimalizace byly provedeny experimenty, kdy byly buňky THP1 stimulovány koktejlem cytokinů, které se na základě dostupné literatury v plasmě pacientů s celiakií vyskytují upregulované. Expresi IRF1 mRNA jsme sledovali ve více časech za účelem vybrání co nejkratšího času, kdy jeho exprese dosahuje nejvyšších hladin. V každém čase jsme měli vždy dvě jamky: vzorek bez cytokinů (0X, kde X = délka stimulace) a jamku označenou IT6X (kde byly buňky stimulované koktejlem cytokinů TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  + IL-6 – každý vždy v koncentraci 80 ng/ml; X = doba stimulace). V prvním experimentu jsme sklízeli THP1 po 0,5 hodině, po 1 hodině, po 2 a 3 hodinách, a sledovali expresi IRF1 mRNA. Výsledky jsou shrnuty na Obrázku 10.



**Obr. 10:** Vliv koktejlu cytokinů na expresi IRF1 mRNA u THP1 buněk po 30 minutách, 1 hodině a 2, 3 a 4 hodinách.

IT6 0,5 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 0,5 hod.), IT6 2 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 2 hod.), IT6 3 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 3 hod.), IT6 4 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 4 hod.).

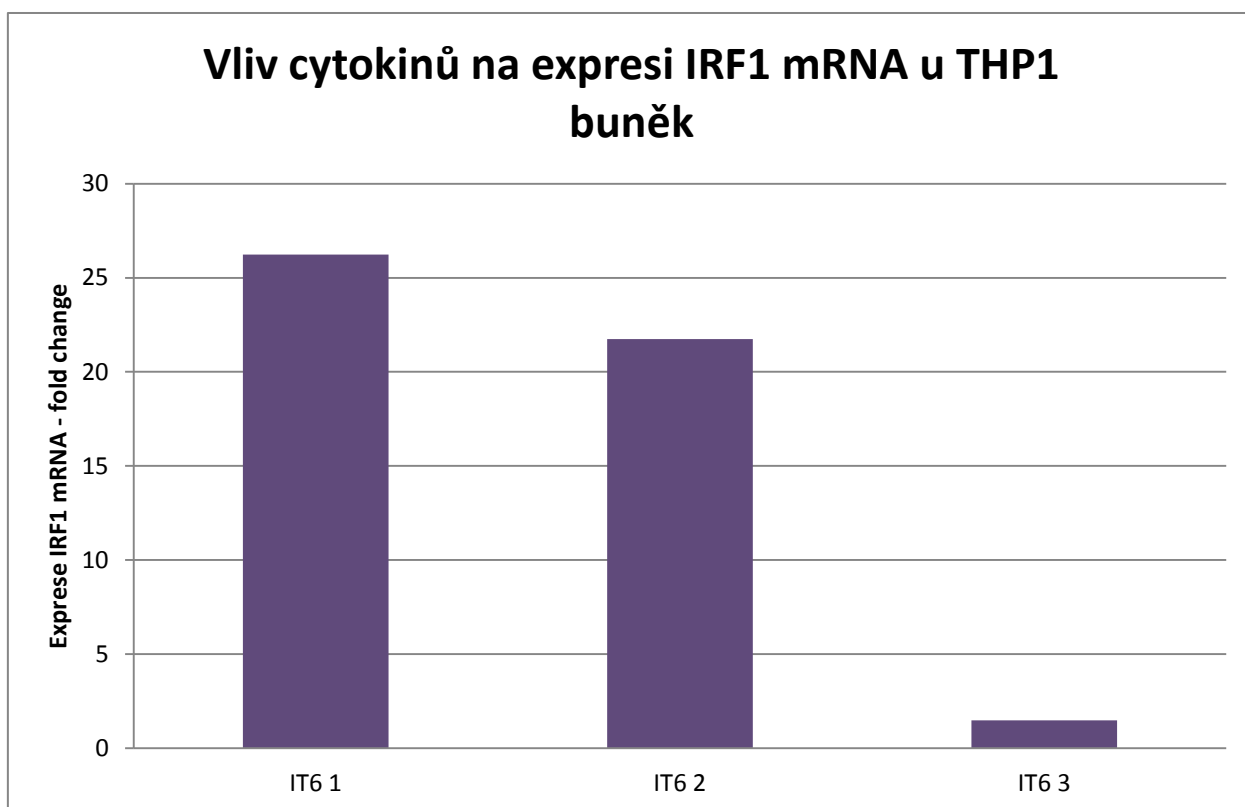
Podle těchto výsledků se zdálo, že exprese IRF1 mRNA měla dva časové píky, kdy dosahovala nejvyšších hodnot, přibližně po hodině a druhý kolem 3 hodin, a proto jsme tento experiment zopakovali s odlišnými časy. V druhém experimentu jsme tedy sklízeli THP1 po 0,75 hod., po 2 hodinách a po 3,5 hodinách a sledovali expresi IRF1 mRNA. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 11.



**Obr. 11:** Vliv koktejlu cytokinů na expresi IRF1 mRNA u THP1 buněk po 45 minutách, 2 hodinách a 3,5 hodinách.

IT6 45 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 45 min.), IT6 2 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 2 hod.), IT6 3.5 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 3,5 hod.).

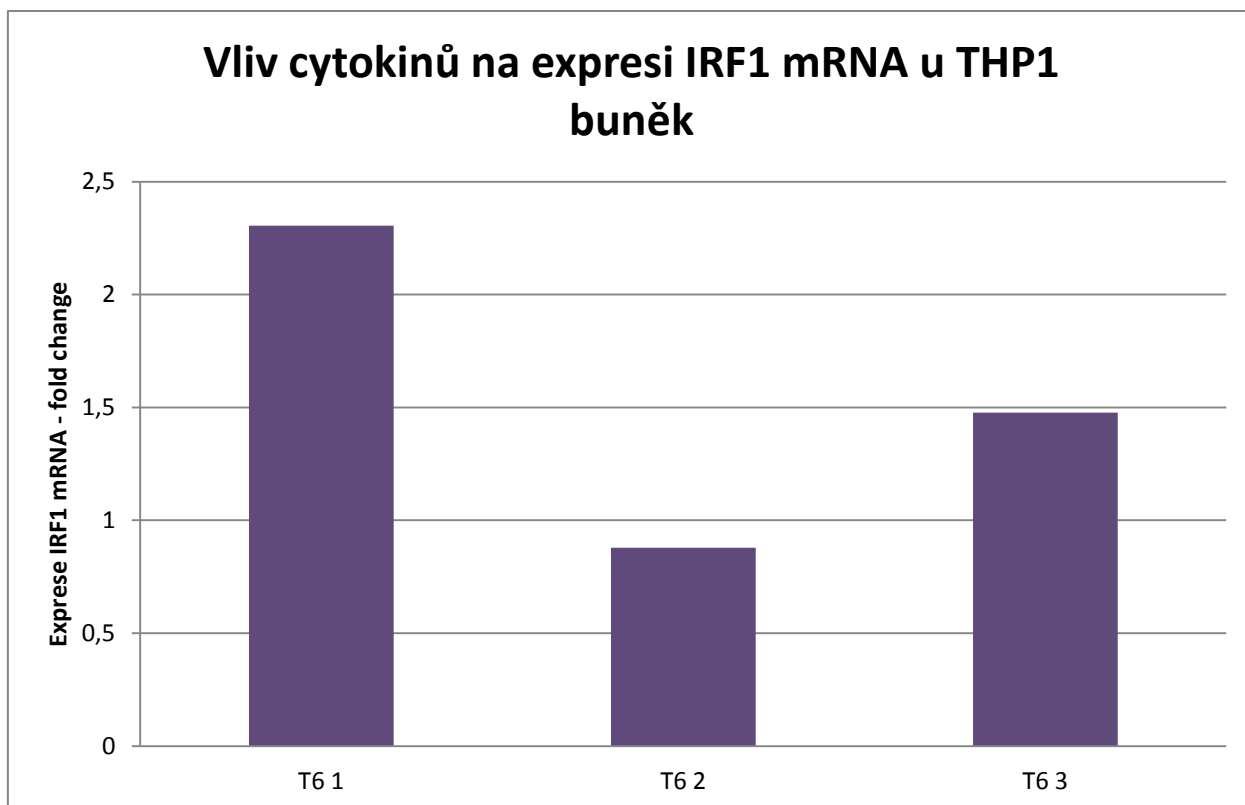
V těchto výsledcích byla nejvyšší exprese IRF1 mRNA po dvouhodinové stimulaci, a proto jsme tento experiment zopakovali potřetí a opět s jinými časy. V třetím experimentu jsme sklízeli THP1 po 1 hodině, po 2 hodinách a po 3 hodinách a sledovali expresi IRF1 mRNA. Výsledky jsou na obrázku 12.



**Obr. 12:** Vliv koktejlu cytokinů na expresi IRF1 mRNA u THP1 buněk po 1 hodině, 2 hodinách a 3 hodinách.

IT6 45 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 1 hod.), IT6 2 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 2 hod.), IT6 3 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 3 hod.).

Po analýze těchto výsledků jsme vybrali 1 hodinu jako ideální čas pro detekci exprese IRF1 mRNA po stimulaci cytokiny. Výběr tohoto času potvrdil i experiment, kde byly THP1 buňky stimulovány jen TNF- $\alpha$  a IL-6. Oproti vzorku bez cytokinů byla nejvíce zvýšená exprese právě po 1 hodině stimulace (viz Obr. 13).

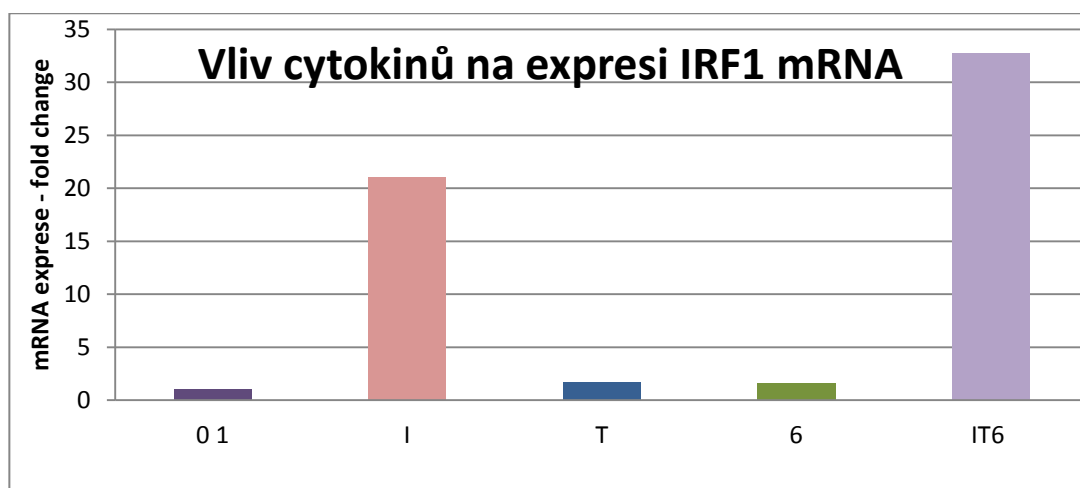


**Obr. 13:** Vliv dvojice cytokinů na expresi IRF1 mRNA po 1, 2 a 3 hodinách.

T6 1 = TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 1 hod.), T6 2 = TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 2 hod.), T6 3 = TNF- $\alpha$  + IL-6 (stimulace 3 hod.)

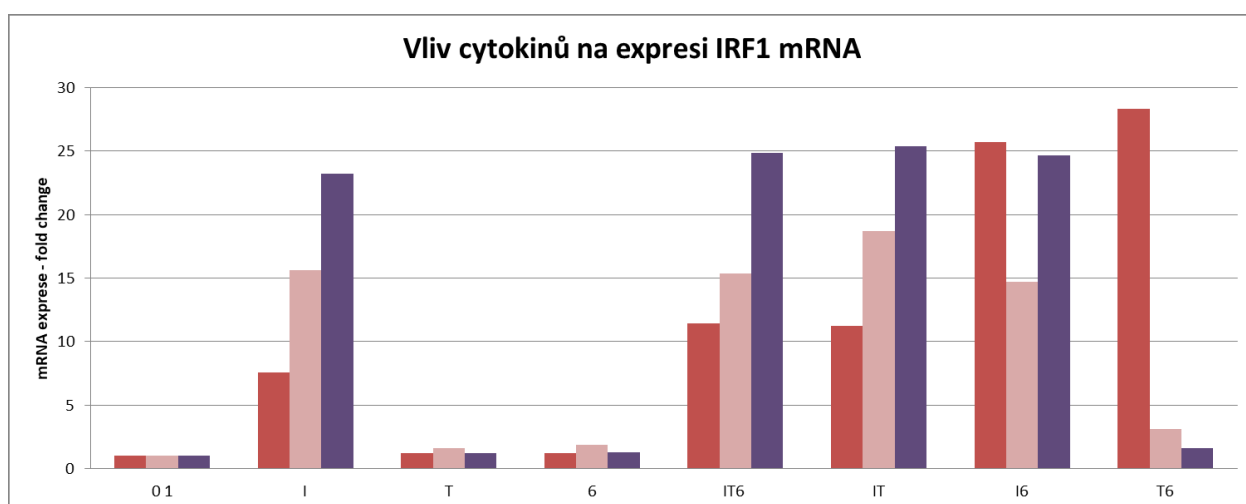
### 3.2.2 Výběr cytokinů pro stimulaci monocytů – optimalizace na THP1 buňkách

Dále bylo třeba vybrat konkrétní cytokiny či kombinace cytokinů, kterými budeme monocyty stimulovat. Výběr a kombinace cytokinů byly prováděny ze zánětlivých cytokinů, které jsou u rCD zvýšené v séru – IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6. Tento výběr byl opět proveden na buňkách THP1, které jsme stimulovali jak jednotlivými cytokiny, tak jejich kombinací a sledovali jsme expresi IRF1 mRNA po 1 hodině. Výsledky jsou na obrázku 14.



**Obr. 14:** Vliv samostatných cytokinů a koktejlu cytokinů na expresi IRF1 mRNA po 1 hodině. 01 – vzorek bez cytokinů; I = IFN- $\gamma$ ; T = TNF- $\alpha$ ; 6 = IL-6; IT6 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6

Tento graf ukazuje, že samostatně má největší efekt IFN- $\gamma$  a nejvíce zvyšují expresi všechny cytokiny dohromady. Abychom přesně věděli, jaký cytokin nebo kombinace cytokinu maximálně zvětšuje expresi IRF1 mRNA, byly provedeny další experimenty, kde byly buňky THP1 stimulovány samostatnými cytokiny (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) a různými kombinacemi cytokinů (například IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ). Výsledky jsou na obrázku 15.



**Obr. 15:** Vliv samostatných cytokinů a různých kombinací cytokinů na expresi IRF1 mRNA po 1 hodině (tři nezávislé experimenty). Barva vždy značí jeden experiment. 01 – vzorek bez cytokinů; I = IFN- $\gamma$ ; T = TNF- $\alpha$ ; 6 = IL-6; IT6 = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6; IT = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ; I6 = IFN- $\gamma$  + IL-6; T6 = TNF- $\alpha$  + IL-6

Z výsledků vyplývá, že samostatně má opět největší efekt IFN- $\gamma$  a nejvíce zvyšují expresi všechny cytokiny dohromady (IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6) a kombinace cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ . Tyto kombinace cytokinů nejen, že nejvíce zvyšují expresi IRF1 mRNA, mají také podobnou tendenci zvýšení této exprese v různých experimentech, a proto bylo pro stimulaci monocytů rozhodnuto použít tyto kombinace cytokinů – I (samostatný IFN- $\gamma$ ), IT6 – koktejl cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6, IT – kombinace cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ .

### 3.2.3 Kultivace a stimulace buněk THP1

#### Protokol:

#### **Použité chemikálie**

**RPMI 1640** – Sigma Aldrich (Německo), w. L-glutamine and NaHCO<sub>2</sub>

**Kompletní medium** – RPMI 1640 + 10% FBS (Biosera, Česká republika) + 1% Penicilin/Streptomycin (Sigma Aldrich, Německo)

→ sterilizace přes filtr 0,22  $\mu$ m (MILLIPORE Gradient systemu; Milli-Q)

**FBS** – Ultra-low endotoxin Fetal Bovine Serum (South America origin) (Biosera); dodavatel BioTech, Česká republika; endotoxin level < 0.1 EU/ml

**IFN- $\gamma$**  – Recombinant Human IFN- $\gamma$  Animal-Free manufactured (Peprtech, Velká Británie); naředěno na koncentraci 1 mg/ml a 100  $\times$  zředěno 5% Trehalosou

**TNF- $\alpha$**  – Recombinant Human TNF- $\alpha$  Animal-Free manufactured (Peprtech, Česká republika); naředěno na koncentraci 0,5 mg/ml a 50  $\times$  zředěno 5% Trehalosou

**IL-6** – Recombinant Human IL-6 Animal-Free manufactured (Peprtech, Česká republika); naředěno na koncentraci 0,25 mg/ml a 25  $\times$  zředěno 5% Trehalosou

**Trehalosa** – Sigma Aldrich (Německo)

**PBS** – BioTech (Česká republika)

**Lyzační roztok** – je součástí kitu (GenElute<sup>TM</sup>Mammalliantotal RNA MiniprepKit), Sigma Aldrich (Německo)

#### **Postup**

1. Do jedné jamky 24jamkové destičky (NUNC, Dánsko) jsme nasadili  $5 \times 10^4$  THP1 buněk.

2. Doplnili jsme do 1 ml kompletním médiem RPMI 1640.
3. V každém experimentu byla vždy jedna jamka nestimulovaná - vzorek bez cytokinů (**0X**) a další stimulované (**IT6X** = IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$  + IL-6 nebo jinými kombinacemi cytokinů; X = čas stimulace).
4. Dávky jednotlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6) byly 80 ng/ml od každého (viz Tab. 2).

**Tab. 2** Dávky cytokinů

VZORKY	CYTOKINY
0X	×
IT6X	80 ng IFN- $\gamma$ + 80 ng TNF- $\alpha$ + 80 ng IL-6

5. Dále jsme buňky stimulovali po dobu, kterou jsme pro daný experiment zvolili (např. 1, 2 nebo 3 hodiny).
6. Po uplynutí dané doby stimulace bylo médium i s buňkami z jamek odsáto.
7. Médium s buňkami bylo stočeno na maximální rychlost otáček (14 000  $\times$  g) po dobu 6 min., poté bylo médium odsáto.
8. Buňky THP1 jsme promyli v PBS a poté jsme přidali 500  $\mu$ l lyzačního roztoku.
9. Buňky v lyzačním roztoku jsme uložili na -20 °C (maximálně na dva měsíce), či rovnou dále izolovali RNA.

### 3.2.4 Izolace RNA

RNA byla izolována z monocytů v lyzačním roztoku, kdy izolace byla prováděna přes kolonky se silikagelovou membránou, které jsou součástí izolačního kitu. Na této membráně byla RNA zachycena a následně promývána a zbavována kontaminujících látek. Na závěr byla RNA uvolněna z membrány do roztoku pomocí vody. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu.

#### Protokol:

#### **Použité chemikálie**

GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, Německo

- lyzační roztok
- 2-merkaptoetanol
- promývací roztok 1



- promývací roztok 2

70% etanol, připravený naředěním z 96% etanolu, P-LAB a.s., Praha

Voda z MILLIPOR Gradient systému; Milli-Q

## Postup

1. K PBMCs (popřípadě k THP1) v lyzačním roztoku jsme přidali 5 $\mu$ l 2-merkaptoetanolu a důkladně zvortexovali.
2. Vzniklou suspenzi jsme napipetovali do GenElute filtrační kolonky (modré) a centrifugovali na 14 000  $\times$  g po dobu 2 minut.
3. Kolonku jsme odstranili a do přefiltrovaného roztoku jsme přidali 500  $\mu$ l 70% etanolu, následně jsme zvortexovali.
4. 500  $\mu$ l vzniklého roztoku jsme napipetovali do GenElute Binding kolonky (červené); roztoku bylo více než 500  $\mu$ l, musel být proto napipetován na kolonku ve dvou krocích.
5. Centrifugovali jsme na 14 000  $\times$  g po dobu 15 vteřin, filtrát jsme vylili, sběrnou zkumavku jsme vrátili zpět pod kolonku a veškerý zbývající roztok jsme napipetovali do kolonky.
6. Opět jsme centrifugovali na 14 000  $\times$  g po dobu 15 vteřin, filtrát jsme vylili, sběrnou zkumavku jsme vrátili zpět pod kolonku.
7. Do kolonky jsme napipetovali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 1 a centrifugovali na 14 000  $\times$  g po dobu 15 vteřin.
8. Kolonku jsme přenesli do čisté sběrné zkumavky a napipetovali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali 14 000  $\times$  g po dobu 15 vteřin.
9. Sběrnou zkumavku jsme vylili, vrátili pod kolonku a opět napipetovali 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali 14 000  $\times$  g po dobu 2 minut.
10. Poté jsme sběrnou zkumavku vylili, vrátili pod kolonku a znovu centrifugovali na 14 000  $\times$  g po dobu 1 minuty, abychom membránu úplně zbavili promývacího roztoku.
11. Přenesli jsme kolonku do čisté sběrné zkumavky, napipetovali 40  $\mu$ l vody a nechali 1 minutu inkubovat při pokojové teplotě.
12. Na závěr jsme centrifugovali na 14 000  $\times$  g po dobu 1 minuty, vyizolovaná RNA byla obsažena ve filtrátu. Koncentraci a čistotu RNA jsme změřili na nanofotometru (NanoPhotometer™ Pearl, Implen) a RNA uchovávali při -80°C

### 3.2.5 Reverzně transkriptázová polymerázová reakce (RT PCR)

Po izolaci RNA z buněk THP1 je koncentrace RNA značně odlišná od koncentrace RNA z monocytů, proto je zde použit jiný kit na RT PCR.

#### **Protokol:**

#### **Použité chemikálie**

HyperSkript RT master mix (with Random hexamer), Gene All, Korea

Voda ze systému MILLIPORE Gradient; Milli-Q

#### **Postup**

1. 2×HyperSkript™ RT master mix solution jsme nechali roztát na ledu. Na jednu reakci jsme použili 10 µl master mixu a udržovali v chladu (na ledu či v mrazícím stojánku).
2. Přidali jsme 20 ng RNA a reakci jsme doplnili vodou do objemu reakce 20 µl.
3. Zkumavky jsme krátce zvortexovali, centrifugovali a do doby, než jsme je vložili do termocyklu, jsme je uchovávali na ledu.
4. V termocyklu (C1000™ Thermal Cycler; Biorad) jsme nastavili program:

1. krok (hybridizace s primery)	5 minut při 25°C
2. krok (extenze)	45 minut při 55°C
3. krok (denaturace enzymu)	5 minut při 95°C
5. Vložili jsme vzorky do termocyklu a proces spustili, po skončení reakce jsme vzorky uchovávali při -20°C.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real Time PCR/QPCR) bude popsána v kapitole (3.3.4) zabývající se již samotným studiem exprese IRF1 mRNA monocytů.

### **3.3 Studium exprese IRF1 mRNA na monocytech**

#### **3.3.1 Separace periferních mononukleárních buněk krve (PBMCs) z plné krve – Ficoll Paque**

Krev byla odebrána do odběrových zkumavek VACUETTE<sup>®</sup> s citrátem (Grenier Bio-one, Rakousko). Separaci PBMCs z periferní krve jsme prováděli pomocí Ficollu. K separaci samotných monocytů došlo v průběhu kultivace pomocí adheze.

#### **Protokol:**

##### **Použité chemikálie**

**HBSS** – 500 ml (EuroClone, Itálie)

**FicollPaque PLUS** - AP Czech (Česká republika); endotoxin tested (<0,12 EU/ml)

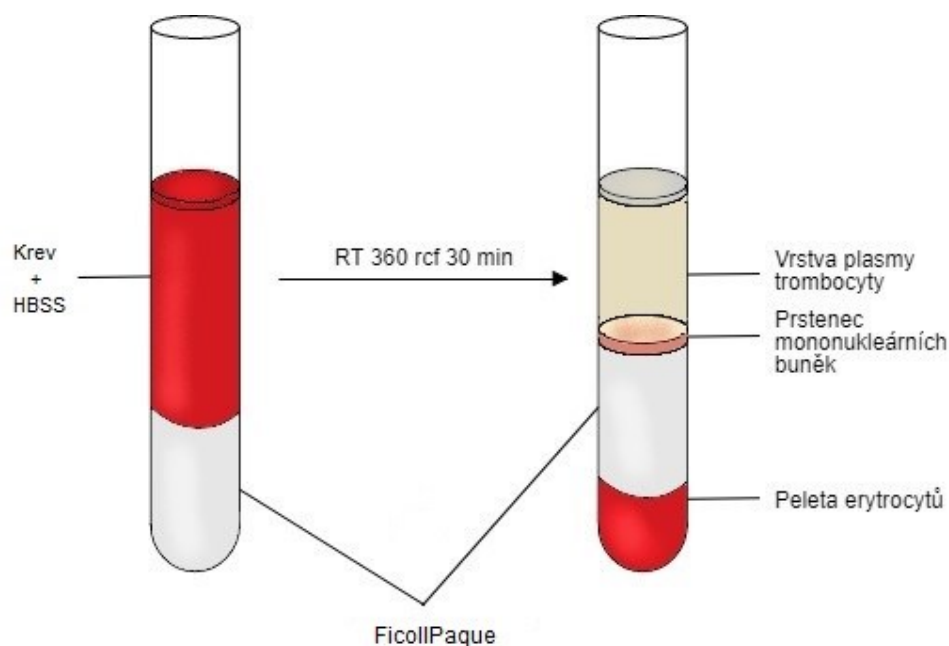
##### **Kompletní kultivační medium:**

- RPMI 1640
- 10% FBS (Biosera, BioTech, Česká republika)
- 1% Penicilin/Streptomycin (Sigma Aldrich, Německo)

po smíchání jednotlivých složek bylo médium sterilizováno přes 0,22 µm filtr (MILLIPORE)

##### **Postup**

1. Nejprve jsme v 15ml zkumavce naředili 2 ml plné krve s 2 ml HBSS.
2. Tuto směs jsme pomalu navrstvili na 3 ml Ficollu temperovaného na pokojovou teplotu a centrifugovali na 1414 rpm (360 rcf) při 17°C (pokojová teplota – RT) na 30 minut.
3. V průběhu centrifugace došlo na základě gradientu k vytvoření vrstev, viz Obr. 16, pipetou jsme opatrně odebrali prstenec mononukleárních buněk bez kontaminace Ficollem.



**Obr. 16:** Rozvrstvení krve a krevních elementů před a po FicollPaque gradientové centrifugaci

4. Odsáté PBMCs jsme promyli v cca 20 – 25 ml HBSS a centrifugovali při 1500 rpm na 10 minut, při pokojové teplotě.
5. Supernatant jsme odlili, vzniklou peletu buněk jsme opatrně vortexovali, ještě jednou promyli v cca 15 ml PBS a centrifugovali na 1250 rpm na 10 minut při RT. Po centrifugaci jsme spočítali buňky resuspendované v 1 ml PBS za pomoci Bürkerovy komůrky.
6. Buňky jsme promyli v cca 15 ml PBS a centrifugovali na 800 rpm na 10 min při RT.
7. Na závěr jsme supernatant odlili, peletu vortexovali a doplnili do 1 ml kompletním kultivačním médiem.

### 3.3.2 Kultivace a stimulace monocytů

Vyizolované mononukleární buňky jsme dále kultivovali a pomocí adheze separovali monocyty, které jsme stimulovali vybranými cytokiny ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{IL-6}$ ). Stimulovali jsme jednotlivými cytokiny a koktejlem dvou či všech tří cytokinů po dobu 1 hodiny, a sledovali vliv těchto cytokinů na monocytární expresi mRNA IRF1 (provedeno u monocytů původem od rCD, CD-CFD i HC). Následně byly provedeny stimulace monocytů po dobu 8 hodin a to pouze dvojicí cytokinů ( $\text{INF-}\gamma$  +  $\text{TNF-}\alpha$ ), která byla vybrána na základě průběžných výsledků (neprezentované výsledky). Tato prodloužená stimulace sloužila ke zhodnocení apo- a parakrinního vlivu IRF1 na monocyty, proto byla po této stimulaci sledována exprese CD95,

CD163 a IL-10 mRNA. Tyto dlouhodobé kultivace byly prováděny na monocytech pocházejících od pacientů s celiakií na dietě a od zdravých kontrol.

### **Protokol:**

#### **Použité chemikálie**

**RPMI 1640** – Sigma Aldrich (Německo), w. L-glutamine and NaHCO<sub>2</sub>

**Kompletní médium** – RPMI 1640 + 10% FBS (Biosera, Česká republika) + 1% Penicilin/Streptomycin (Sigma Aldrich, Německo) → sterilizace přes filtr 0,22 μm (MILLIPOR Gradient systemu; Milli-Q)

**FBS** – Ultra-low endotoxin Fetal Bovine Serum (South America origin) (Biosera); dodavatel BioTech, Česká republika; endotoxin level < 0.1 EU/ml

**IFN-γ** – Recombinant Human IFN-γ Animal-Free manufactured (Peprtech, Česká republika); naředěno na koncentraci 1 mg/ml a 100 × zředěno 5% Trehalosou

**TNF-α** – Recombinant Human TNF-α Animal-Free manufactured (Peprtech, Česká republika); naředěno na koncentraci 0,5 mg/ml a 50 × zředěno 5% Trehalosou

**IL-6** – Recombinant Human IL-6 Animal-Free manufactured (Peprtech, Česká republika); naředěno na koncentraci 0,25 mg/ml a 25 × zředěno 5% Trehalosou

**Lyzační roztok** – je součástí kitu (GenElute<sup>TM</sup>Mammalliantotal RNA MiniprepKit), Sigma Aldrich (Německo)

**Trehalosa** – Sigma Aldrich (Německo)

**PBS** – BioTech (Česká republika)

#### **Postup**

1. Do jedné jamky 24jamkové destičky (NUNC, Dánsko) jsme nasadili  $2,5 \times 10^6$  buněk.
2. Doplnili jsme do 1 ml kompletním médiem RPMI 1640.
3. Destičky jsme ponechali 20 – 24 hodin v CO<sub>2</sub> inkubátoru, pouze v mezičase po 7 hodinách jsme vyměnili médium a odstranili tím nepřisedlé buňky (adherované monocyty zůstaly).
4. Sebrali jsme médium, opláchli jsme jamku 1 ml média a přidali jsme do dvou jamek po 1 ml RPMI 1640 (vzorek bez cytokinů – označen jako 01 a 08), další čtyři jamky jsme

stimulovali cytokiny rozpuštěnými v 1 ml média (**I** = IFN- $\gamma$ ; **IT** = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ; **IT8** = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ; **IT6** = IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6). Dávky jednotlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6) byly 80 ng/ml od každého (viz Tab. 3).

**Tab. 3** Dávky cytokinů

VZORKY	CYTOKINY
01	×
I	80 ng IFN- $\gamma$
IT6	80 ng IFN- $\gamma$ + 80 ng TNF- $\alpha$ + 80 ng IL-6
IT	80 ng IFN- $\gamma$ + 80 ng TNF- $\alpha$
08	×
IT 8	80 ng IFN- $\gamma$ + 80 ng TNF- $\alpha$

- Vzorky jsme nechali 1 hod., (01, I, IT6, IT) a 8 hod. (08 a IT8) v CO<sub>2</sub> inkubátoru stimulovat a poté adherované buňky opláchli 1 ml PBS temperovaným na pokojovou teplotu. Dále jsme přidali 500  $\mu$ l lyzačního roztoku (součástí kitu na izolaci RNA – viz níže).
- Buňky v lyzačním roztoku jsme uložili na -20°C (maximálně na dva měsíce), či rovnou dále izolovali RNA (3.2.4).

### 3.3.3 Reverzně transkriptázová polymerázová reakce (RT PCR)

Pomocí RT PCR jsme přepsali RNA do cDNA, která byla dále použita pro kvantitativní PCR v reálném čase. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu.

#### **Protokol:**

##### **Použité chemikálie**

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Thermo Fisher Scientific, USA

- 10  $\times$  RT pufr
- 25  $\times$  dNTP Mix (100 mM)
- 10  $\times$  RT náhodné primery
- MultiScribe Reverse Transcriptase

Voda ze systému MILLIPOR Gradient; Milli-Q

#### **Postup**

1. Všechny komponenty kitu jsme nechali roztát na ledu.
2. Na základě počtu reakcí jsme si připravili základní reakční směs podle Tab. 4, kde je uvedeno množství na jednu reakci. Reakce bez reverzní transkriptázy slouží jako negativní kontrola.

**Tab. 4** Složení reakční směsi pro jednu reakci RT PCR

Komponenty	Objem (μl)	
	Směs s reverzní transkriptázou	Směs bez reverzní transkriptázy
10 × RT pufr	2,0	2,0
25 × dNTP Mix (100 mM)	0,8	0,8
10 × RT náhodné primery	2,0	2,0
MultiScribe reverzní transkriptáza	1,0	-
Voda	4,2	5,2
<b>Celkem</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

3. Reakční směs jsme vortexovali a udržovali na ledu.
4. Do každé mikrozkušavky jsme napipetovali 10 μl reakční směsi.
5. Přidali jsme maximální možné množství RNA a doplnili jsme vodou do objemu reakce 20 μl.
6. Zkušavky jsme krátce centrifugovali a do doby, než jsme je vložili do termocykleru, jsme je uchovávali na ledu.
7. V termocykleru (C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler; Biorad) jsme nastavili program:
 

1. krok (hybridizace s primery):	10 minut při 25°C
2. krok (extenze):	120 minut při 37°C
3. krok (denaturace enzymů):	5 vteřin při 85°C
8. Vložili jsme vzorky do termocykleru a proces spustili, po skončení reakce jsme vzorky uchovávali při -20°C.

### 3.3.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real Time PCR/QPCR)

Real Time PCR je PCR, kdy dostáváme informaci o stavu amplifikace během reakce. K měření genové exprese specifického produktu dochází pomocí fluorescenčních sond, tzv. TaqMan® sond (Applied Biosystems, Life Technologies – Thermo Fisher Scientific). Fluorescenční aktivita sond přímo odpovídá množství PCR produktu v reakci a tato aktivita je zaznamenávána pomocí laseru, který je zabudován ve speciálních cyklerech (LightCycler 480, ROCHE), signál z laseru je převáděn do amplifikačních křivek pomocí softwaru (LightCycler 480 SW 1.5). V našich experimentech se jednalo o relativní kvantifikaci, kdy jsme ze tří získaných hodnot Ct pro každý gen vypočítali průměrné Ct pro daný vzorek, které bylo použito k výpočtu dCt, jenž značí relativní rozdíl exprese námi sledovaného genu a referenčního genu (zde byl gen *PGK1* – fosfoglycerát kináza 1) v rámci jednoho vzorku. Hodnota dCt dále posloužila k výpočtu  $2^{-dCt}$ , který vypovídá o míře exprese jednotlivých genů a který byl v případě genů *CD95*, *CD163* a *IL-10* násoben 100 z důvodu lepší manipulace a názornosti při zobrazování v grafech. Tyto hodnoty byly následně statisticky zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 5.

#### Použitý přístroj

LightCycler 480, ROCHE, Česká republika

#### Použité chemikálie

qPCR BIO Probe Mix No ROX, BioConsult, Česká republika

Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix; Thermo Fisher Scientific, USA

**PGK1** – Hs99999906\_m1 (phosphoglycerate kinase 1)

**IRF1** – Hs00971960\_m1 (interferon regulatory factor 1)

**CD95** – Hs00236330\_m1

**CD163** – Hs00174705\_m1

**IL-10** – Hs00961622\_m1 (interleukin 10)

Voda ze systému MILLIPOR Gradient; Milli-Q

#### Postup

1. Assays-on-Demand (zakryté před světlem) a cDNA jsme nechali rozmrazit při pokojové teplotě.
2. Pro každý gen jsme připravili reakční směs podle tabulky 5.



**Tab. 5** Složení reakční směsi pro Real Time PCR pro jednu reakci

Komponenty	Objem (μl)
TaqMan Gene Expression Master Mix	7
20× Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix	0,7
Voda	2,3
<b>Celkem</b>	<b>10</b>

3. Do 384jamkové destičky jsme napipetovali po 10 μl směsi pro daný gen, příklad rozmístění vzorků v destičce viz tab. 6. Reakce byla prováděna v technických tripletech.

**Tab. 6.** Příklad rozmístění reakčních směsí pro jednotlivé geny a cDNA u detekce exprese IRF1 mRNA

		PGK1			IRF1			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		01	01	01	01	01	01	
C		I	I	I	I	I	I	
D		IT6	IT6	IT6	IT6	IT6	IT6	
E		IT	IT	IT	IT	IT	IT	
F								

4. cDNA jsme 4× naředili vodou.  
 5. Do příslušných jamek jsme napipetovali 4 μl 4× naředěné cDNA.  
 6. Destičku jsme přelepili fólií a dvě minuty centrifugovali při 2 500 × g.  
 7. Destičku jsme vložili do přístroje LighCycler 480. Podmínky reakce byly nastaveny dle následujících parametrů:

- |                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. krok:                        | 2 minuty při 50°C  |
| 2. krok (hot start):            | 10 minut při 95°C  |
| 3. krok (denaturace):           | 15 vteřin při 95°C |
| 4. krok (hybridizace, extenze): | 1 minuta při 60°C  |
- (kroky 3 a 4 se opakují 50×)

8. Po dokončení byla získaná data uložena a následně statisticky zpracována.

### **3.3.5 Statistické zpracování**

Statistické vyhodnocení jsme prováděli pomocí statistického programu GraphPad Prism 5, kde jsme nejprve ověřili normalitu dat pomocí Shapirův-Wilkův test, který však pracuje s minimálním  $n = 7$ , tudíž v případě  $n = 5$  nebylo možno testovat jejich normální rozdělení, a proto u těchto dat byly použity neparametrické testy (Kruskal-Wallis pro vícečetná porovnání a Man-Whitney test pro porovnání dvou proměnných). Tyto neparametrické testy byly použity i v ostatních případech, protože u žádných dat nebylo detekováno normální rozdělení. Hranice statistické významnosti byla  $p < 0,05$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 Exprese IRF1 mRNA monocyty recentních pacientů a pacientů na bezlepkové dietě

Během pracování na tématu DP bylo možné z důvodů blíže vysvětlených v diskuzi získat materiál od pouhých 5 kompletně diagnostikovaných nových, tedy recentních pacientů, jejichž monocyty byly použity pro stimulace vybranými cytokiny (Materiál a metody, kapitola 3.2.2). Z důvodu nízkého počtu jedinců v souboru byly pro hodnocení dat použity neparametrické testy (Kruskal-Wallis a Man-Whitney test). Pozorován byl signifikantní rozdíl v míře exprese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům bez stimulace ( $p = 0,0117$ ) (viz Tab. 7 a Obr. 17).

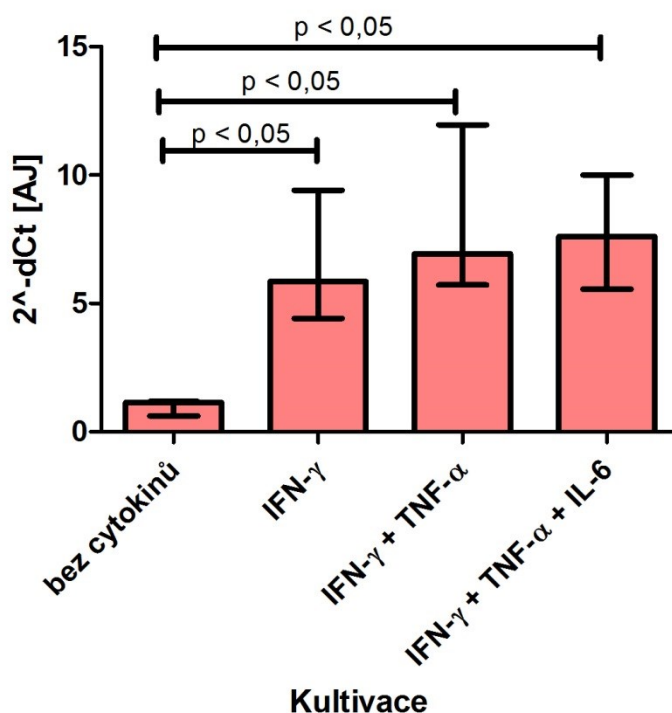
**Tab. 7** Exprese IRF1 mRNA monocyty rCD ( $n = 5$ )

<b>kultivace</b>	<b>medián [AJ]</b>	<b>mezikvartilové rozpětí</b>	<b>zvýšení exprese vůči kultivaci bez cytokinů</b>
<b>bez cytokinů</b>	1,14	0,62 – 1,18	1 ×
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	5,86	4,42 – 9,40	5,14 × (*)
<b>IFN-<math>\gamma</math> + TNF-<math>\alpha</math></b>	6,93	5,72 – 11,96	6,08 × (*)
<b>IFN-<math>\gamma</math> + TNF-<math>\alpha</math> + IL-6</b>	7,60	5,55 – 12,18	6,67 × (*)

AJ ~ arbitrární jednotky

(\*)  $P < 0,05$

## Expese IRF1 mRNA monocyty rCD



**Obr. 17:** Expese IRF1 mRNA monocyty rCD

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí;  $n = 5$ ; AJ ~ arbitrární jednotky, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL- 6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa, rCD ~ recentní pacienti s celiakií

Vedle rCD pacientů byl získáván také biologický materiál od CD-GFD, kteří pohlavím a věkem (+/- 2 roky) odpovídali nově diagnostikovaným rCD pacientům. U CD-GFD jedinců byla také pozorována signifikantně zvýšená expese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům bez stimulace (viz Tab. 8 a Obr. 18) a v případě stimulace všemi cytokiny (IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6) až 8,27 $\times$  oproti monocytům bez stimulace cytokiny (viz Tab. 11). Zvýšení expese IRF1 mRNA bylo tedy v případě CD-GFD ještě větší než u rCD (viz Tab. 7).

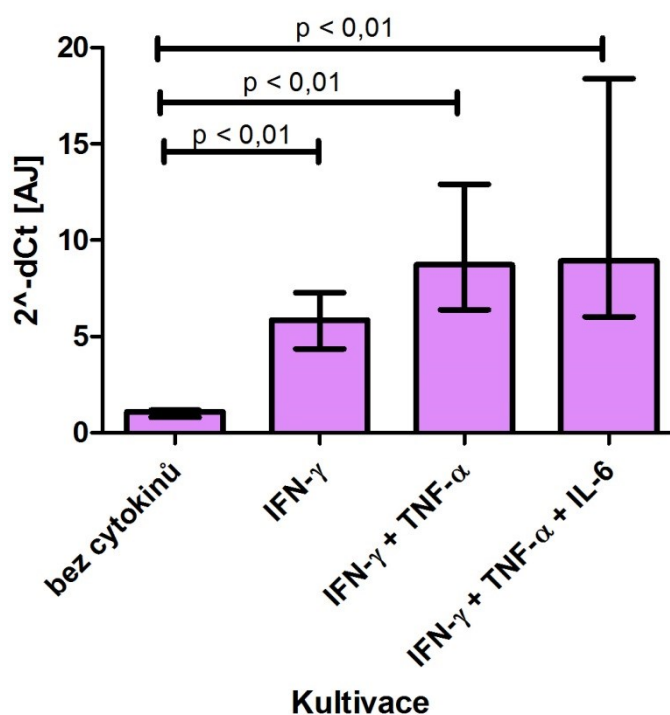
**Tab. 8** Expres IRF1 mRNA monocyty CD-GFD (n = 5)

kultivace	medián [AJ]	mezikvartilové rozpětí	zvýšení exprese vůči kultivaci bez cytokinů
bez cytokinů	1,08	0,80 – 1,18	1 ×
IFN- $\gamma$	5,86	4,35 – 7,27	5,43 × (**)
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	8,73	6,39 – 12,31	8,08 × (**)
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ + IL-6	8,93	6,02 – 18,40	8,27 × (**)

AJ ~ arbitrární jednotky

(\*\*)  $P < 0,01$

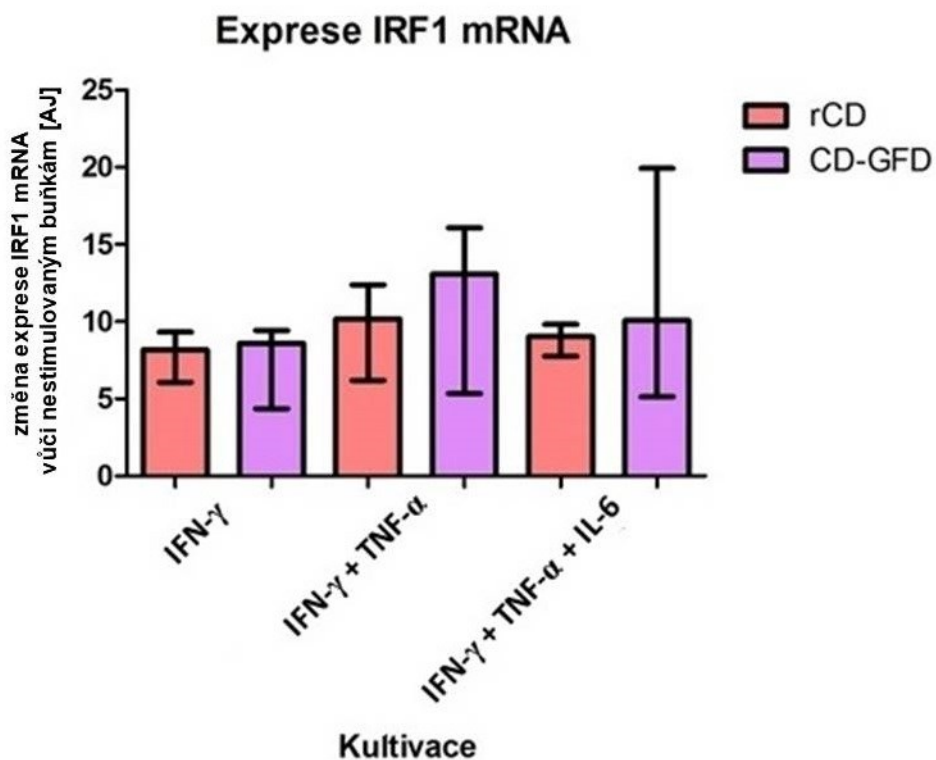
### Expres IRF1 mRNA monocyty CD-GFD



**Obr. 18:** Expres IRF1 mRNA monocyty CD-GFD

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí, n = 5; AJ ~ arbitrární jednotky, CD-GFD ~ pacienti s celiakií na bezlepkové dietě, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL-6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa

Vzhledem k tomu, že reakce monocytů získaných od rCD pacientů na působení zánětlivých agens se statisticky významně nelišily od těch pozorovaných u monocytů od pacientů CD-GFD (viz Tab. 10 a Tab.11,  $p = \text{NS}$ ), došlo k navýšení počtu CD-GFD ( $n = 10$ ), kteří jsou pro nás dostupnější, a nadále se pracovalo jen s daty od CD-GFD jedinců. K nim byly získány vzorky od 10 věkově a pohlavím odpovídajících zdravých jedinců, díky nimž jsme mohli sledovat fyziologickou reakci monocytů na toto zánětlivé prostředí.



**Obr. 19:** Porovnání exprese IRF1 mRNA mezi rCD ( $n = 5$ ) a CD-GFD ( $n = 5$ )

Graf zobrazuje změnu exprese IRF1 mRNA v buňkách, jež byly stimulovány vybranými zánětlivými cytokiny, vůči nestimulovaným buňkám. Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí; AJ ~ arbitrární jednotky, CD-GFD ~ pacienti s celiakií na bezlepkové dietě, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL-6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa, rCD ~ recentní pacienti s celiakií

#### 4.2 Expresse IRF1 mRNA monocytů pacientů na bezlepkové dietě a zdravých dárců

Po navýšení množství pacientů na bezlepkové dietě ( $n = 10$ ) zůstaly rozdíly mezi stimulovanými a nestimulovanými vzorky totožné jako v případě pěti pacientů, avšak zvýšila se míra signifikance rozdílů ( $p < 0,0001$ ) (viz Obr. 20) a také mírně velikost rozdílů exprese (viz

Tab. 9). Data neměla normální rozdělení, proto byly opět použity neparametrické testy (Kruskal-Wallis a Man-Whitney test).

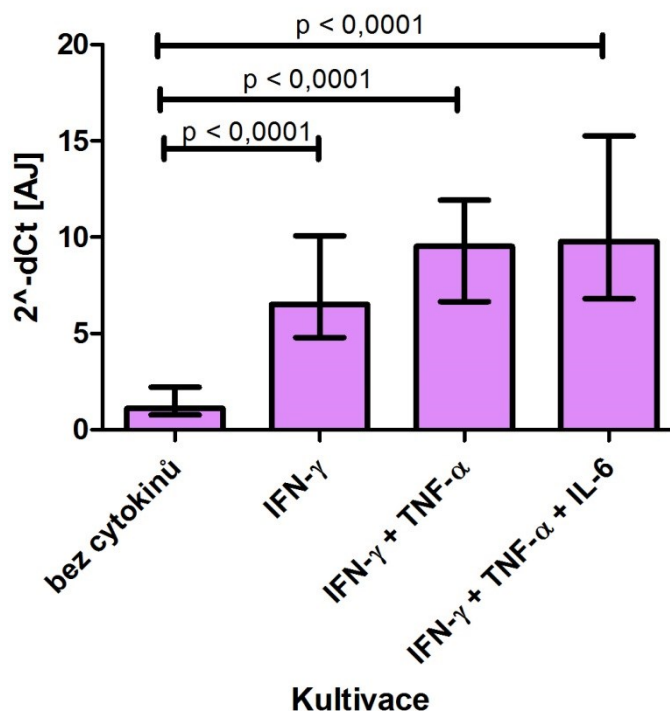
**Tab. 9** Expresse IRF1 mRNA monocyty CD-GFD (n = 10)

kultivace	medián [AJ]	mezikvartilové rozpětí	zvýšení exprese vůči kultivaci bez cytokinů
bez cytokinů	1,12	0,77 – 2,21	1 ×
IFN- $\gamma$	6,51	4,80 – 10,07	5,81 × (***)
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	9,52	6,66 – 11,92	8,50 × (***)
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ + IL-6	9,78	6,81 – 15,26	8,73 × (***)

AJ ~ arbitrární jednotky

(\*\*\*)  $P < 0,0001$

### Expresse IRF1 mRNA monocyty CD-GFD



**Obr. 20:** Expresse IRF1 mRNA monocyty CD-GFD

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí, n = 10; AJ ~ arbitrární jednotky, CD-GFD ~ pacienti

s celiakií na bezlepkové dietě, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL-6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa

Podobně jako u monocytů původem od CD-GFD pacientů bylo v případě zdravých dárců detekováno signifikantní zvýšení exprese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům nestimulovaným (viz Tab. 10 a Obr. 21).

**Tab. 10** Expresa IRF1 mRNA monocytů HC (n = 10)

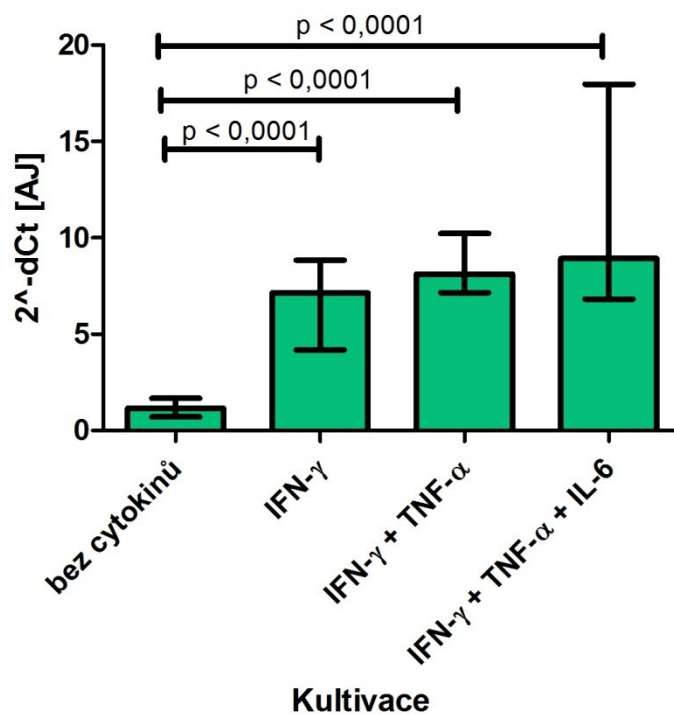
<b>kultivace</b>	<b>medián [AJ]</b>	<b>mezikvartilové rozpětí</b>	<b>zvýšení exprese vůči kultivaci bez cytokinů</b>
<b>bez cytokinů</b>	1,15	0,71 – 1,68	1 ×
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	7,15	4,19 – 8,85	6,22 × (***)
<b>IFN-<math>\gamma</math> + TNF-<math>\alpha</math></b>	8,12	7,16 – 10,22	7,06 × (***)
<b>IFN-<math>\gamma</math> + TNF-<math>\alpha</math> + IL-6</b>	8,93	6,82 – 17,79	7,77 × (***)

AJ ~ arbitrární jednotky

(\*\*\*) P < 0,0001



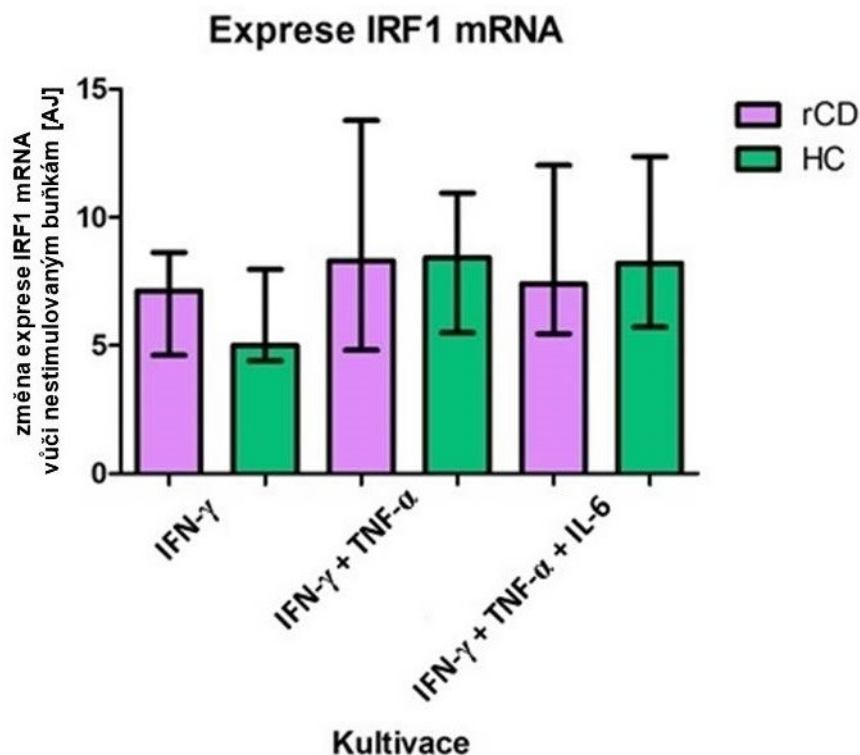
## Expese IRF1 mRNA monocyty HC



**Obr. 21:** Expese IRF1 mRNA monocyty zdravých kontrol

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí;  $n = 10$ ; AJ ~ arbitrární jednotky, HC ~ zdravé kontroly, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL-6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa

Při porovnání jedinců CD-GFD a zdravých kontrol nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami (viz Tab. 12, Tab. 13 a Obr. 22).



**Obr. 22:** Porovnání exprese IRF1 mRNA mezi CD-GFD (n = 10) a HC (n = 10)

Graf zobrazuje změnu exprese IRF1 mRNA v buňkách, jež byly stimulovány vybranými zánětlivými cytokiny, vůči nestimulovaným buňkám. Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí; AJ ~ arbitrární jednotky, CD-GFD ~ pacienti s celiakií na bezlepkové dietě, HC ~ zdravé kontroly, IFN- $\gamma$  ~ interferon gamma, IL-6 ~ interleukin 6, TNF- $\alpha$  ~ tumor nekrotizující faktor alfa

### 4.3 Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty

Monocyty pěti pacientů na bezlepkové dietě a pěti zdravých kontrol stejného pohlaví a věku jsme stimulovali po dobu 8 hod. kombinací dvou cytokinů (IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ), abychom poté analyzovali efekt zvýšených hladin IRF1 na monocyty. Tuto kombinaci jsme vybrali, protože předběžné výsledky stimulace touto kombinací cytokinů ukazovaly na nejefektivnější kombinaci, při níž exprese IRF1 mRNA dosahovala největší změny oproti nestimulovanému vzorku monocytů (neprezentované výsledky). Pomocí metody QPCR jsme detekovali změnu exprese CD95 mRNA, markeru apoptózy, a protizánětlivých markerů CD163 a IL-10.

### 4.3.1 Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty CD-GFD pacientů

Detekce mRNA markerů CD95, CD163 a IL-10 u CD-GFD monocytů stimulovaných pomocí IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  ukazuje poměrně zřetelný trend nárůstu exprese apoptotického markeru CD95 mRNA a snížení exprese obou protizánětlivých markerů CD163 a IL-10 mRNA (viz Tab. 11). Výjimku představují vzorky SC34 a SC35, kdy z důvodu nedetekovatelné hladiny exprese u nestimulovaných buněk nebylo změnu exprese možno hodnotit.

**Tab. 11** Změna exprese cílových markerů po stimulaci monocytů CD-GFD pacientů

experiment	zvýšení IRF1 mRNA po 1 hod.	změna CD95	změna CD163	změna IL-10
SC37	5,721	4,013 ↑	6,460 ↓	4,559 ↓
SC34	8,667	Nelze hodnotit	15,793 ↓	1,693 ↓
SC35	9,272	Nelze hodnotit	2,341 ↓	2,838 ↓
SC38	4,850	3,809 ↑	13,204 ↓	9,276 ↓
SC39	4,742	4,260 ↑	11,170 ↓	1,644 ↓

Vzhledem k tomu, že v případě exprese CD95 mRNA nebylo možné dva vzorky hodnotit, nepřicházelo v úvahu ani následné statistické zpracování. Exprese CD163 mRNA byla u stimulovaných monocytů signifikantně snížena oproti monocytům bez cytokinové stimulace ( $p = 0,008$ ) (viz Tab. 15 a Obr. 23). Pozorovaný trend snížení exprese IL-10 mRNA u stimulovaných monocytů nebyl statisticky významný ( $p = \text{NS}$ ) (viz Tab. 12 a Obr. 23).

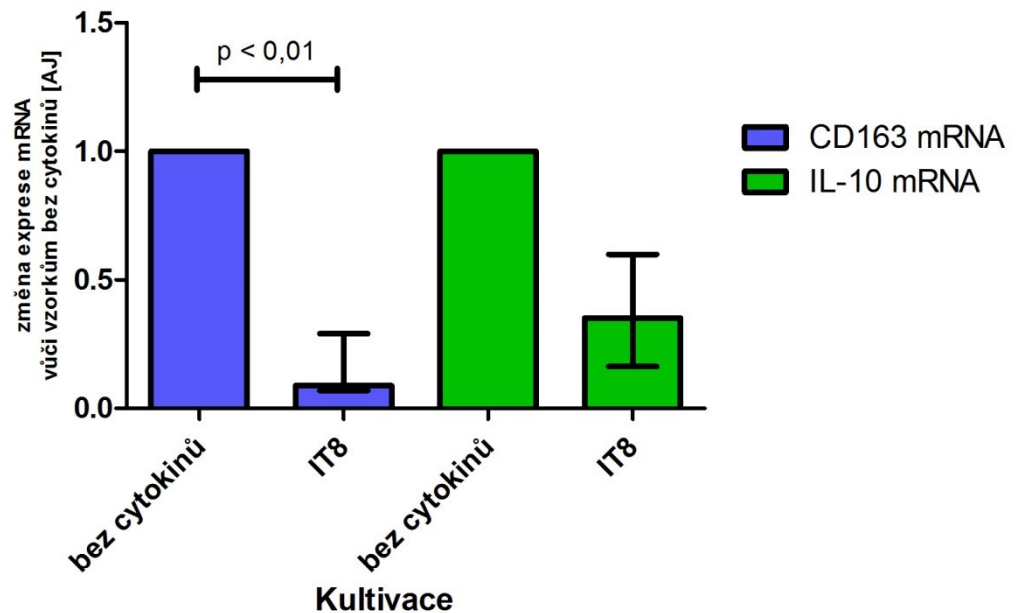
**Tab. 12** Exprese protizánětlivých markerů monocyty CD-GFD ( $n = 5$ )

CD163	medián [AJ]	mezikvartilové rozpětí	snížení exprese vůči monocytům bez cytokinů
bez cytokinů	52,03	22,27 – 71,21	1 ×
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	6,36	2,86 – 8,22	8,18 × (**)
<b>IL-10</b>			
bez cytokinů	3,57	2,63 – 7,70	1 ×
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	1,56	0,57 – 4,02	2,29 ×

AJ ~ arbitrární jednotky

(\*\*)  $P < 0,01$

## Expresse protizánětlivých markerů u CD-GFD



**Obr. 23:** Expresse CD163 mRNA a IL-10 mRNA monocyty CD-GFD pacientů po stimulaci zánětlivými cytokiny

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí,  $n = 5$ ; AJ ~ arbitrární jednotky násobené 100, CD163 ~ diferenciační antigen 163, IL-10 ~ interleukin 10, IT8 ~ 8 hod. stimulace interferonem gamma a tumor nekrotizujícím faktorem alfa, mRNA ~ mediátorová ribonukleová kyselina

Výše uvedená data naznačují, že monocytární IRF1 vyprodukovaný na základě působení zánětlivých cytokinů by mohl zpětně působit auto- či parakrinně na monocyty, na což ty reagují změnou v expresi markeru CD163 a statisticky nevýznamně i CD95 a IL-10. Zajímalo nás proto, zda a případně jak souvisí konkrétní velikost změny v hladinách IRF1 mRNA po 1 hod. stimulace monocyty se změnou v expresi mRNA markerů CD95, CD163 a IL-10 po 8 hodinách stimulace (v obou případech stimulace probíhala pod vlivem cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ). Expresse IRF1 mRNA však s žádným z vybraných markerů nekoreluje ( $p = \text{NS}$ ).

### 4.3.2 Efekt zvýšených hladin IRF1 mRNA na monocyty zdravých dárců

Změny exprese vybraných cílových markerů u monocytů zdravých kontrol nejsou tak jednoznačně interpretovatelné jako u pacientů (viz výše). U vzorku s nejvyšší expresí IRF1 mRNA po hodině stimulace, SC33, byla exprese všech tří následně stanovovaných markerů zvýšena; v případě vzorku s druhou nejvyšší expresí IRF1 mRNA (SC44) byla exprese CD95 a

IL-10 mRNA po 8 hodinách stimulace beze změny, a monocyty od dárce SC46, jež na zánětlivý stimul zareagovaly jen relativně mírným, pětinasobným nárůstem exprese IRF1 mRNA, zvýšily po 8 hodinách produkci apoptotického CD95, ale snížily expresi protizánětlivého CD163 a výrazně omezily protizánětlivý IL-10, tedy jde o model pozorovaný u monocytů pacientů CD-GFD (viz Tab. 16). U vzorku SC43 s nejnižší expesí IRF1 mRNA (po 1 hod. stimulace IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ ) nebylo možné hodnotit expresi CD95 mRNA ani IL-10 mRNA (viz Tab. 13).

**Tab. 13** Změna exprese cílových markerů po stimulaci monocytů zdravých dárců

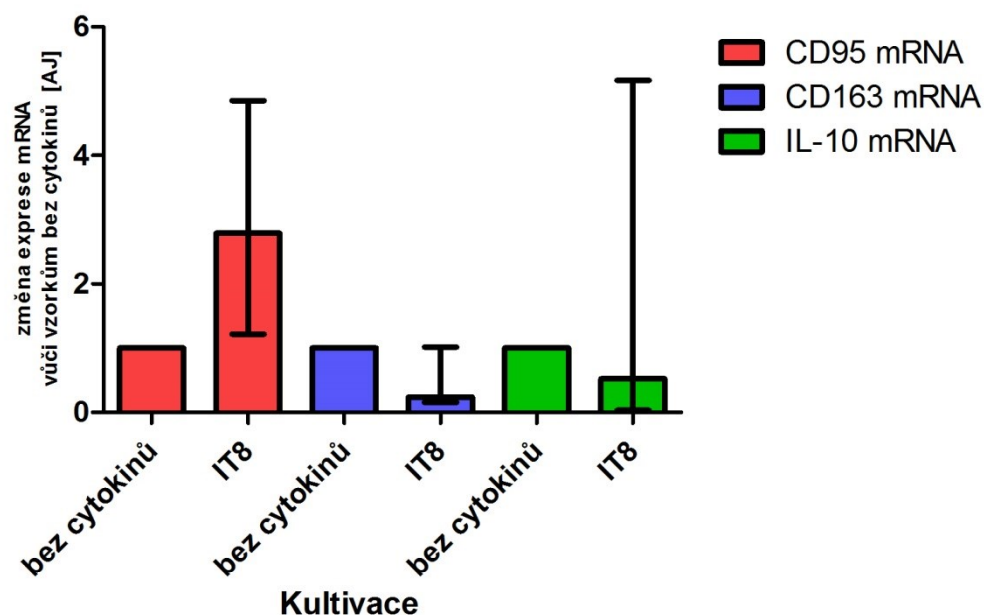
experiment	zvýšení IRF1 mRNA po 1 hod.	změna CD95		změna CD163		změna IL-10	
SC33	13,857	2,045	↑	1,585	↑	6,555	↑
SC46	4,954	3,535	↑	4,251	↓	20,054	↓
SC44	11,111	Beze změny		5,325	↓	Beze změny	
SC45	10,888	5,292	↑	7,978	↓	37,667	↓
SC43	3,668	Nelze hodnotit		2,224	↓	Nelze hodnotit	

Pozorované trendy zvýšené či snížené exprese markerů CD95, CD163 a IL-10 nebyly u monocytů zdravých dárců ani v jednom případě statisticky signifikantní ( $p = NS$ ) (viz Tab. 14 a Obr. 24). Obdobně jako u monocytů pacientů s celiakií nekorelovaly hladiny IRF1 mRNA (po 1 hod. stimulace) s hladinami exprese vybraných markerů po dlouhodobé stimulaci ( $p = NS$ ).

**Tab. 14** Expese vybraných markerů monocytů HC (n = 5)

	medián [AJ]	mezikvartilové rozpětí	Změna exprese vůči monocytům bez cytokinů
<b>CD95</b>			
bez cytokinů	16,70	4,44 – 67,74	1 ×
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	39,06	20,59 – 71,05	2,34 × zvýšená exprese
<b>CD163</b>			
bez cytokinů	65,02	15,63 – 70,75	1 ×
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	9,18	7,07 – 22,64	7,08 × snížená exprese
<b>IL-10</b>			
bez cytokinů	3,99	0,36 – 16,03	1 ×
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	7,19	4,82 – 10,94	1,80 × snížená exprese

## Expresa sledovaných markerů u monocytů HC



**Obr. 24:** Porovnání exprese CD95, CD163 a IL-10 mRNA monocytů zdravých kontrol

Vodorovná čára rovnoběžná s osou x tvořící vrchní část obdélníku značí medián, úsečky na ni kolmé vymezují mezikvartilové rozpětí,  $n = 5$ ; AJ ~ arbitrární jednotky násobené 100, CD163 ~ diferenciatní antigen 163, CD95 ~ diferenciatní antigen 95, IL-10 ~ interleukin 10, IT8 ~ 8 hod. stimulace interferonem gamma a tumor nekrotizujícím faktorem alfa, mRNA ~ mediátorová ribonukleová kyselina

## 5 Diskuze

Naše experimenty byly zaměřeny na přiblížení vlivu zánětlivých cytokinů IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6, zvýšených v séru pacientů s recentní celiakií, na monocyty periferní krve. V první řadě jsme sledovali, zda toto zánětlivé prostředí ovlivňuje expresi interferon regulujícího faktoru 1. Tuto změnu exprese IRF1 na úrovni mRNA jsme nejprve sledovali u 5 recentních pacientů s celiakií a 5 pacientů s celiakií adherujících po dobu alespoň 1 roku k bezlepkové dietě. Zajímalo nás, zda zánětlivé prostředí předpokládané u rCD jedinců má vliv na pozdější kontakt rCD monocytů s námi vybranými cytokiny, a zda se budou monocyty pocházející od CD-GFD pacientů lišit ve své reakci na tyto zánětlivé cytokiny. Tato informace pro nás byla podstatná také proto, že jsme se potýkali s velmi nízkými počty rCD (viz dále) a nahrazení rCD jedinců pacienty na bezlepkové dietě (v případě nelišící se reakce monocytů) bylo možným východiskem, jak naplnit cíle studie, k čemuž jsme se ve finále uchýlili (viz dále).

Změna exprese IRF1 mRNA byla sledovaná po stimulaci monocytů třemi vybranými kombinacemi cytokinů (IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6). Dle očekávání byla exprese IRF1 mRNA zvýšena ve všech analyzovaných skupinách a byl pozorován signifikantní rozdíl v míře exprese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům bez stimulace (např. Obr. 17). Tyto výsledky podporují náš předpoklad, že zánětlivé prostředí vede ke zvýšení exprese IRF1 mRNA u monocytů, což může být důležité pro rozvoj a udržování zánětu u celiakie, kde je *IRF1* pozitivním a funkčním kandidátním genem (Monteleone et al. 2001).

Při porovnání obou skupin pacientů s celiakií (rCD vs. CD-GFD) nebyly pozorovány mezi jednotlivými skupinami signifikantní rozdíly (viz Obr. 19). Zřejmě tedy monocyty od obou skupin pacientů reagují na zánětlivé prostředí stejně, bez ohledu na aktivitu celiakie, a buňky rCD jedinců nejsou z periferie se zvýšenými hladinami zánětlivých faktorů citlivější k těmto cytokinům či naopak jimi přestimulované. Mohli bychom spekulovat, že pacienti na bezlepkové dietě nedodržují tuto dietu striktně a kvůli tomu mohou v jejich tenkém střevě a na periférii probíhat stejné zánětlivé procesy jako u recentních pacientů, avšak CD-GFD pacienti z naší studie mají hladiny protilátek proti TG2 v normě (neprezentovaná data), tudíž je velmi pravděpodobné, že tito pacienti dietu dodržují a střevní zánět v rozsahu jako u recentních pacientů není přítomen. Proto jsme se také rozhodli rozšířit soubor pacientů na bezlepkové dietě (bez ohledu na množství recentních pacientů) a pro posuzování odlišností mezi celiakií a fyziologickým stavem porovnat data z tohoto rozšířeného souboru CD-GFD s výstupy získanými studiem monocytů od zdravých jedinců, kteří věkem (+/- 2 roky) i pohlavím odpovídali CD-GFD subjektům. Buňky těchto HC nám měly v první řadě umožnit poznat fyziologické reakce

monocytů na zánětlivé cytokiny. Z tohoto důvodu jsme také v pozdějších analýzách nesloučili data získaná od 5 rCD pacientů s daty od 10 CD-GFD (i když by to vzhledem k nedetekovaným odlišnostem bylo možné), ale narušilo by to složení skupiny pacientů a zdravých kontrol pro vzájemné porovnání.

U navýšeného počtu CD-GFD ( $n = 10$ ) zůstaly rozdíly mezi vzorky obdobné jako v případě pěti pacientů, avšak zvýšila se míra signifikance ( $p < 0,0001$ ) (viz Obr. 20). U zdravých dárců byla monocytární exprese IRF1 mRNA zvýšena také, byl pozorován signifikantní rozdíl v míře exprese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům bez stimulace (viz Obr. 21). Při porovnání exprese IRF1 mRNA CD-GFD pacientů se zdravými kontrolami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly (viz Obr. 22). Na základě analýzy exprese IRF1 mRNA pacientů s celiakií (recentních a na bezlepkové dietě) a zdravých dárců lze říci, že není rozdíl, jakého původu jsou monocyty, tedy zda pocházejí od pacientů s celiakií nebo od zdravého dárce.

V rámci paralelního projektu byla v naší laboratoři pomocí BioPlexu EXP Hu Cyto GRP1 3-plex (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) (BioRad) měřena koncentrace cytokinů IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6 v séru u pacientů rCD, CD-GFD a u zdravých dárců, a bylo pozorováno, že v hladinách těchto cytokinů není mezi jednotlivými skupinami rozdíl, jinými slovy, předpokládaný střevní zánět u jedinců s akutní, neléčenou formou CD, se nikterak neprojevuje na periférii (nepublikovaná data). To je v rozporu s výchozími předpoklady této studie založenými na dříve publikovaných datech (Lahat et al. 1999, Romaldini et al. 2002, Manavalan et al. 2010, Forsberg et al. 2002), avšak celkem by tento nálezn odpovídal námi pozorované podobné reakci monocytů bez ohledu na jejich zdroj (pacient či zdravý dárce). Pro případný laboratorní model v dalších studiích tak bude jednodušší používat monocyty zdravých dárců, především v případě, kdy nejsou k dispozici recentní pacienti s neléčenou celiakií.

Následně jsme se soustředili na vliv samotných zvýšených hladin IRF1 na monocyty; na základě teoretických údajů z literatury jsme vybrali tři cílové markery – marker apoptózy CD95 a dva protizánětlivé markery (CD163, IL-10), které se v souvislosti s celiakií a aktivitou IRF1 zdály jako nejvhodnější kandidáty na toto ověření případného autokrinního či parakrinního vlivu IRF1 na monocyty (Daly et al. 2006, Manavalan et al. 2010, Maiuri et al. 2001). Relativní hladiny exprese mRNA těchto markerů byly stanoveny po 8hodinové stimulaci kombinací cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  u 5 pacientů s celiakií na bezlepkové dietě a u 5 zdravých dárců, v obou skupinách byly porovnány změny vůči nestimulovaným vzorkům a korelovány s hladinou exprese IRF1 mRNA po 1 hodině stimulace totožnými cytokiny.



IRF1 reguluje transkripci souboru cílových genů, které hrají stěžejní roli v celé řadě fyziologických a patologických procesů včetně virové infekce, imunitní odpovědi proti nádorům, prozánětlivého poškození, rozvoje imunitního systému, progresu buněčného cyklu a apoptózy (Dou et al. 2014, Bole-Feysot et al. 2000). Jedním z našich předpokladů bylo, že po déletrvající stimulaci monocytů (8 hodin) bude možné sledovat expresi některých markerů, které jsou zodpovědné za určitý proces v organismu (apoptóza nebo protizánětlivá odpověď, případně diferenciaci). Expresie těchto faktorů by mohla být zvýšená právě kvůli IRF1, protože IRF1 koordinuje apoptózu, aktivaci a diferenciaci různých typů imunitních buněk, a přispívá k účinné imunitní odpovědi. Abnormality v regulaci těchto procesů řízených IRF1 jsou základem patogeneze mnoha autoimunitních poruch, např. roztroušené sklerózy a experimentální autoimunní encefalitidy (Giannouli et al. 2014). Kombinace cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  pro pozorování efektu IRF1 na cílové geny byla vybrána na základě průběžných výsledků, kdy byl u této dvojice cytokinů pozorován největší vliv na expresi IRF1 mRNA (neprezentovaná data).

Detekce markerů CD95, CD163 a IL-10 u stimulovaných monocytů ukazuje trend zvýšené exprese mRNA apoptotického markeru CD95, a naopak snížené exprese mRNA obou protizánětlivých markerů CD163 a IL-10 (viz Tab. 11). Bohužel jsou výjimky, kdy z důvodu nedetekovatelné hladiny exprese nestimulovaného vzorku nebylo změnu exprese možno u vzorku statisticky hodnotit – tato situace nastala u markeru apoptózy CD95. Analýza exprese markerů CD163 a IL-10 je na Obr. 23. Expresie CD163 mRNA byla u stimulovaných monocytů CD-GFD signifikantně snížena oproti monocytům nevystaveným *in vitro* zánětlivému prostředí v podobě cytokinů IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ). Lze spekulovat, že pokles exprese CD163 mRNA je u CD-GFD výraznější než u zdravých kontrol, kde tento pokles nebyl signifikantní a také dokonce zde byl jeden vzorek s efektem minimálního nárůstu. Pozorovaný trend snížení exprese IL-10 mRNA u stimulovaných monocytů nebyl podložen signifikancí ( $p = \text{NS}$ ) ani u CD-GFD, ani u HC, avšak pokles u monocytů CD-GFD byl menší (maximálně 8  $\times$ ), zatímco u HC jsou velikost a směr změny exprese IL-10 výrazně proměnlivé (od snížení exprese téměř 40  $\times$ , přes nulovou změnu až naopak do plusových hodnot téměř k sedminásobnému nárůstu exprese). Jedná se o jednotlivé vzorky, avšak možná tu pozorujeme efekt, kdy je intra populační variabilita u HC větší než u CD-GFD.

Trend nárůstu exprese markeru apoptózy CD95 u pacientů s celiakií na bezlepkové dietě i u zdravých dárců naznačuje, že exprese IRF1 mRNA by mohla vést k apoptóze monocytů. Zvýšení exprese markeru vedoucího k apoptóze by bylo v souladu s pozorováním Conte a kol. (2003), jejichž experimenty a výsledky naznačují, že IRF1 přispívá po stimulaci IFN- $\gamma$  k senzibilizaci monocytů na CD95-zprostředkovanou apoptózu. Oproti tomu data podporující, že za sníženou expresi CD163 mRNA by byl zodpovědný IRF1, chybí. Stimulace cytokiny

samozřejmě mohla ovlivnit také expresi jiného transkripčního faktoru a ten se posléze jako prostředník mohl podílet na snížení exprese CD163 mRNA, která byla u monocytů i makrofágů po působení těchto cytokinů dokumentována (Buechler et al. 2000). Obdobný princip by mohl být uplatněn i v případě snížené exprese u IL-10 mRNA, protože inhibiční účinky IFN- $\gamma$  na expresi IL-10 u monocytů již byly pozorovány (Donnelly et al. 1995). V případě snížení exprese CD163 mRNA lze také spekulovat o tom, že zřejmě nedochází působením těchto zánětlivých cytokinů k diferenciaci monocytů v makrofágy, protože u nich je pozorováno zvýšení CD163 mRNA i proteinu (Wenzel et al. 1996), což také podporuje pozorované současné snížení exprese IL-10 mRNA, což je cytokin produkovaný ve velké míře makrofágy typu M2. M2 makrofágy se však z monocytů diferencují působením cytokinů IL-4 a IL-13, oproti M1 makrofágům, které se diferencují pod vlivem prozánětlivého cytokinu IFN- $\gamma$ , jenž byl v našich stimulacích použit. Pro M1 makrofágy je charakteristická produkce prozánětlivých cytokinů, především IL-12, který jsme se snažili po 8hodinové stimulaci IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  také detekovat, avšak i přesto, že jsme vyzkoušely více přístupů, jsme nebyli schopni IL-12 mRNA stanovit (nepublikovaná data). Exprese IL-12 mRNA tedy mohla být na extrémně nízkých až nedetekovatelných hladinách (což by opět podporovalo spekulaci, že nedocházelo k diferenciaci v makrofágy), nebo nebyla detekována z technických důvodů. Pokles diferenciaci v makrofágy má vliv na imunitní odpověď pomocí fagocytózy, protože makrofágy pohlcují a degradují mrtvé buňky, buněčné zbytky a cizí materiál v tkáních celého těla (Varol C et al. 2015). Spolu se snížením protizánětlivého účinku CD163 a IL-10 se takto mohou zánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  podílet na vzniku a udržování zánětu u celiakie. Je však také možné, že vybrané protizánětlivé markery nejsou aktivní při imunitní odpovědi u pacientů s celiakií, ale existují jiné markery, které bychom v další práci mohli otestovat, abychom ověřili, že u monocytů je snížena imunitní odpověď při zánětu v tenkém střevě při celiakií, nebo že tato odpověď je spuštěna pomocí jiné signální dráhy.

Předmětem našeho zájmu bylo také ověřit, zda hladiny exprese IRF1 mRNA po 1 hodině stimulace (IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ) korelují s hladinami mRNA cílových markerů CD95, CD163 a IL-10 po osmihodinové stimulaci. Exprese IRF1 mRNA však s žádným z vybraných markerů nekorelují, ani u monocytů zdravých dárců, ani u pacientů na bezlepkové dietě ( $p = NS$ ). V tomto případě je důležité pamatovat, že hladiny exprese markeru CD95 některých vzorků nebylo možné hodnotit, a proto korelace mezi expresí IRF1 mRNA a tohoto markeru nebyla statisticky hodnocena. Zvýšení exprese IRF1 mRNA tedy pozitivně ani negativně nekoreluje s expresí vybraných markerů (CD163 a IL-10) detekovaných po 8 hod. stimulace. Nelze však tvrdit, že v případě absence korelace zvýšená exprese IRF1 monocyty neovlivňuje, ale ani také že je jednoznačně ovlivňuje (viz výše).

V případě naší práce se jedná o pilotní data a výsledky, pro podpoření našich tvrzení by bylo vhodné zvýšit počet pacientů s celiakií a zdravých dárců, určit exprese mRNA markerů námi vybraných i dalších a definovat korelace. Bohužel však získávání krevního materiálu od pacientů s kompletní diagnózou celiakie je obtížné, obzvláště pak od recentních pacientů, kteří ještě nedrží bezlepkovou dietu. Navzdory odhadované relativně vysoké frekvenci celiakie v populaci jsou počty pacientů s kompletní diagnózou provedenou na základě kritérií ESPHGAN (Riordan and Davidson 1991) a Marsh (Marsh 1992) nízké, protože větší část pacientů při pozitivním nálezu zvýšených protilátek v séru (první fáze diagnostiky celiakie – viz kap. 1.1) začne držet bezlepkovou dietu, aniž by došlo k potvrzení celiakie střevní biopsií, kterou z důvodu nepříjemnosti tohoto zákroku odmítají. Takoví pacienti bez kompletní diagnózy není možné pro tento výzkum použít. Při případném potvrzení v této práci prezentovaných nálezů na větším souboru by bylo vhodné zařadit také funkční ověření vlivu IRF1 na monocyty v zánětlivých podmínkách, například prostřednictvím inhibice exprese pomocí miRNA.

## 6 Závěr

V rámci diplomové práce jsme pomocí metody QPCR stanovili relativní hladiny IRF1 mRNA u 15 pacientů s celiakií (5 recentních a 10 dodržujících bezlepkovou dietu) a 10 zdravých dárců po 1 hod. stimulace zánětlivými cytokiny IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-6. Dále jsme stanovili hladiny mRNA markeru apoptózy CD95 a markerů protizánětlivé reakce CD163 a IL-10 u 5 pacientů s celiakií na bezlepkové dietě a 5 zdravých dárců po 8 hodinové stimulaci zánětlivými cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Získaná data jsme mezi sebou porovnali, statisticky vyhodnotili a dospěli k následujícím závěrům:

- Zánětlivé prostředí (vytvářené vybranými cytokiny) způsobuje u monocytů zvýšení exprese IRF1 mRNA, protože byl pozorován signifikantní rozdíl v míře exprese IRF1 mRNA u monocytů stimulovaných cytokiny oproti monocytům bez stimulace. U recentních pacientů byl nárůst exprese téměř šestinásobný ( $p < 0,05$ ), u pacientů na bezlepkové dietě 7,7násobný ( $p < 0,0001$ ) a u zdravých dárců sedminásobný ( $p < 0,0001$ ).
- Monocyty od rCD pacientů, od pacientů CD-GFD a od zdravých kontrol se signifikantně neliší v expresi IRF1 mRNA.
- U monocytů od CD-GFD pacientů stimulovaných cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  jsme pozorovali trend k nárůstu exprese apoptotického markeru CD95 mRNA, který však nemohl být z důvodu počtu vzorků statisticky potvrzen. Exprese CD163 mRNA byla u stimulovaných monocytů signifikantně osmkrát snížena oproti monocytům bez stimulace ( $p = 0,008$ ). Pozorovaný trend poklesu exprese IL-10 mRNA u stimulovaných monocytů nebyl podložen signifikancí ( $p = \text{NS}$ ).
- U monocytů od HC byly pozorovány trendy nárůstu exprese apoptotického markeru CD95 mRNA a poklesu exprese protizánětlivých markerů CD163 a IL-10, tato pozorování však nebyla ani v jednom případě statisticky signifikantní ( $p = \text{NS}$ ).
- Trendy změn exprese naznačují, že zvýšení hladin IRF1 mRNA vede spíše k apoptóze (zvýšení exprese CD95 mRNA) než k protizánětlivé reakci (snížení exprese protizánětlivých markerů CD163 a IL-10 mRNA).
- Hladiny exprese IRF1 mRNA s žádným z cílových markerů (CD95, CD163 a IL-10) nekorelují ani u monocytů zdravých dárců, ani u pacientů na bezlepkové dietě ( $p = \text{NS}$ ).

## 7 Seznam použitých zkratek

AJ – arbitrární jednotky

AP-1 – faktor regulace transkripce

APC – antigen prezentující buňky

APO-1/CD95 – diferenciacní antigen 95

CCR3 - C-C typ chemokinového receptoru

CD – celiakie

CD (např. CD14, CD163) – diferenciacní antigen (např. diferenciacní antigen 14, 163)

CD-GFD – pacient s celiakií na bezlepkové dietě

cDNA – komplementární molekula k DNA

CSFs – kolonie stimulující faktory

CTL – cytotoxické T-lymfocyty

DC – dendritické buňky

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Fas/CD95 - diferenciacní antigen 95

FasL – Fas ligand

FcRs – Fc receptory

GAF – gamma aktivační faktor

GAS – gama aktivační místo

GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů

gp130 – glykoprotein130

Hb-Hp – hemoglobin-haptoglobin

HBSS – Hank's balanced salt solution

HC – zdraví dárce

HLA – lidské leukocytární antigeny

HLA – lidský leukocytární antigen typu DQ2/ DQ8/E

I – samostatný IFN- $\gamma$

ICE – interleukin-1 beta-konvertující enzym

IEL – intraepiteliální lymfocyty

IFNs – interferony

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IFN $\gamma$ R1/2 – receptory 1/2 IFN- $\gamma$

IgA – imunoglobulin A, E, ...

IGF-1 – inzulinový růstový faktor 1

IL (např. IL-6/IL-10/IL-15) – interleukin (například interleukin 6/10/15)

IL-6R – receptor interleukinu 6

ILs – interleukiny

iNOS – isoforma syntázy oxidu dusnatého

IRF1 – interferon regulující faktor 1

IT – koktejl cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$

IT6 – koktejl cytokinů IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-6

JAK/STAT – signální dráha Janus kinázy a signálního transduktoru a aktivátoru transkripce

JAK-1/2/3 – Janus kináza 1/2/3

LPM2 – integrální membránový protein 2

LPS – lipopolysacharid

MIC – HLA molekuly I. třídy

MMP - matrixové metaloproteinázy

MPS – mononukleární-fagocytární systém

mRNA – informační nebo mediátorová RNA

NF-kappaB/NFκB – jaderný faktor kappa B

NK lymfocyt – „přirozený zabíječ“ lymfocyt

NKG2D – NK buňky aktivují receptor typu 3D

NKT lymfocyt – T-lymfocyt, který má některé vlastnosti NK lymfocytů

NO – oxid dusnatý

p53 – transkripční faktor zabraňující vzniku nádorů

PBM – monocyty periferní krve

PBMCs – mononukleární buňky periferní krve

PBS – fosfat-buffered saline (fosfátový pufr)

PCR – polymerázová řetězová reakce

pDCs – plazmacytoidní DCs

PGK1 – fosfoglycerát kináza 1

PRR – receptor rozpoznávající vzory

rCD – recentní pacient s celiakií

Real Time PCR/QPCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

RT – pokojová teplota

RT PCR – reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce

SH2B3 – adaptér proteinu SH2B 3

SP1 – faktor regulace transkripce

SRCR - scavenger receptor bohatý na cystein

STAT1/3/5b signální transduktor a aktivátor transkripce 1/3 /5

TAP 1 –transportér spojený se zpracováním antigenů 1

TCR – receptor T lymfocytů pro antigen

TG2/tTG2/tTG – tkáňová transglutamináza 2

Th1/2/17 – pomocný T lymfocyt 1/2/17

THP1 – monocytární buněčná linie

TLRs - Toll-like receptory

TNFR1/2 – receptory 1/2 TNF- $\alpha$

TNFs – faktory nekrotizující nádory

TNF- $\alpha$  – faktor nekrotizující nádory  $\alpha$

TYK2 – tyrosin kináza 2



## 8 Seznam použité literatury

- Akbari O, DeKruyff RH, and Umetsu DT. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunology* 2:725-731.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127(3):701-721.
- Auffray C, Sieweke MH, and Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 27:669–692.
- Bach EA, Aguet M, and Schreiber RD. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology* 15:563-591.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, and Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology* 15:749-795.
- Bogdan C. 2000. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Immunology* 12(4):419–424.
- Bole-Feysot C, Perret E, Roustan P, Bouchard B, Kelly PA. 2000. Analysis of prolactin-modulated gene expression profiles during the Nb2 cell cycle using differential screening techniques. *Genome Biology* 1(4):1-15.
- Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M. 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177(11):7551-7558.
- Briani C, Samaroo D, and Alaedini A. 2008. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 7(8):644-650.

- Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, Watling D, Harpur AG, Wilks AF, et al. 1996. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *The EMBO Journal* 15(4):799–809.
- Brynychova I, Hoffmanova I, Dvorak M, and Dankova P. 2016. Increased Expression of TLR4 and TLR7 but Not Prolactin mRNA by Peripheral Blood Monocytes in Active Celiac Disease. *Original Papers* 25(5):887-893.
- Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, and Schmitz G. 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro and anti-inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67(1):97–103.
- Chan H, Bartos DP, and Owen-Schaub LB. 1999. Activation-Dependent Transcriptional Regulation of the Human fas Promoter Requires NF- $\kappa$ B p50-p65 Recruitment. *Mol Cell Biol* 19(3):2098-2108.
- Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, and Benjamin RS. 2007. Correlation of Computed Tomography and Positron Emission Tomography in Patients With Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor Treated at a Single Institution With Imatinib Mesylate: Proposal of New Computed Tomography Response Criteria. *Journal of Clinical Oncology* 25(13):1753-1759.
- Choukair D, Hügel U, Sander A, Uhlmann L, and Tönshoff B. 2014. Inhibition of IGF-I-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Pediatric Research* 76:245–51.
- Chow WA, Fang JJ, and Yee JK. 2000. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *The Journal of Immunology* 164(7):3512–3518.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, and Corazza GR. 2005. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* 140(3):408-416.
- Clevenger CV, Rycyzyn MA, Syed F, Kline JB. 2001. Prolactin Receptor Signal Transduction. *Prolactine* 12:355-379.

- Conte E, Manzella L, Zeuner A, Cocchiario G, Conticello C et al. 2003. Involvement of interferon regulatory factor-1 in monocyte CD95 expression and CD95-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10:615-617.
- Daly A, Walsh C, Feighery C, O'Shea U, Jackson J, and Whelan A. 2006. Serum levels of soluble CD163 correlate with the inflammatory process in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24(3):553-559.
- Darnell JE, Kerr IM, and Stark GR. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164):1415-1421.
- Darnell JE. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277(5332):1630-1635.
- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, and Srinivasan S. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *The Journal of Immunology* 145(3):940-944.
- Donnelly RP, Freeman SL, and Hayes MP. 1995. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol* 155(3):1420-1427.
- Dou L, Lianga HF, Gellerb DA, Chena YF, Chen XP. 2014. The regulation role of interferon regulatory factor-1 gene and clinical relevance. *Human Immunology* 75(11):1110-1114.
- Dubiński A, and Zdrojewicz Z. 2007. The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis. *Europe PMC* 2(130):291-294.
- Dupuis S, Doffinger R, Picard C, Fieschi C, Altare F, Jouanguy E, et al. 2000. Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunological Reviews* 178(1):129-37.

- Edwards AD, Manickasingham SP, Spörri R, et al. 2002. Microbial recognition via Toll- like receptor- dependent and - independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169(7):3652-3660.
- Fabriek BO, Dijkstra CD, and van den Berg TK. 2005. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 210(2-4):153-160.
- Fabriek BO, Polfliet MM, Vloet RP, et al. 2007. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* 109(12):5223-5229.
- Farber JM. 1992. A collection of messenger-rna species that are inducible in the raw-264.7 mouse macrophage cell-line by gamma interferon and other agents. *Molecular and Cellular Biology* 12(4):1535-1545.
- Forsberg G, Hernell O, Melgar S, et al. 2002. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 123(3): 667–678.
- Fraser JS, Engel W, Ellis HJ, Moodie SJ, Pollock EL, Wieser H, and Ciclitira PJ. 2003. Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* 52(12):1698-1702.
- Garnier-Lenglinéa H, Cerf-Bensussana N, and Ruemmele FM. 2015. Celiac disease in children. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 39(5):544-551.
- Gaspari S, Marcovecchio ML, Breda L, Chiarelli F. Growth in juvenile idiopathic arthritis: the role of inflammation. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:104–10.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71–82.
- Genomics and Biomarkers* 1:1-2.
- Gerber JS, and Mosser DM. 2001. Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc $\gamma$  Receptors. *J Immunol* 166(11):6861-6868.

- Giannouli S, Tzoanopoulos D, Ritis K, Kartalis G, Moutsopoulos HM, and Voulgarelis M. 2004. Autoimmune manifestations in human myelodysplasia: a positive correlation with interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63(5):578–582.
- Goff WL, Johnson WC, Wyatt CR, and Cluff CW. 1996. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet Immunol Immunopathol* 55(1-3):45–62.
- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3:23–35.
- Grage-Griebenow E, Flad HD, and Ernst M. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69(1):11–20.
- Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, et al. 1993. Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *European Journal of Immunology* 23(12):3126–3135.
- Green PHR, Lebowitz B, and Greywoode R. 2015. Celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135(5):1099-1106.
- Harris LA, Park JY, Voltaggio L, and Lam-Himlin D. 2012. Celiac disease: clinical, endoscopic, and histopathologic review. *Gastrointestinal Endoscopy* 76(3):625-640.
- Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, and Meagher LC. 1994. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos. Trans. R Soc. London B* 345(1313):327-333.
- Haslett C. 1999. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 160(1):S5-11.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, and Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(P1):1–20.

- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, and Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334(2):297–314.
- Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology* 14:821–830.
- Hogger P, Dreier J, Droste A, Buck F, and Sorg C. 1998. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoidinducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J Immunol* 161(4): 1883-1890.
- Honda K, Takaoka A, and Taniguchi T. 2006. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25(3)349–360.
- Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, and Persson LA. 2002. Breast-feeding protects against celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75(5):914-921.
- Jabri B, Kasarda DD, and Green PHR. 2005. Innate and adaptive immunity: the Yin and Yang of celiac disease. *Immunological Reviews* 206(1):219-231.
- Jason S. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. 2004. The JAK/STAT signaling Pathway. *Journal of Cell Science* 117: 1281-1283.
- Kagnoff MF. 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 117(1):41-49.
- Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, et al. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263(5153):1612–1615.
- Kano A, Haruyama T, Akaike T, and Watanabe Y. 1999. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 257(3):672–677.

- Kapur G, Patwari AK, Narayan S, and Anand VK. 2004. Serum prolactin in celiac disease. *Journal of Tropical Pediatrics* 50(1):37-40.
- Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, and W. C. Liles. 1997. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 185(8):1511-1516.
- Krammer PH, Dhein J, Walczak H, et al. 1994. The Role of APO-1-Mediated Apoptosis in the Immune System. *Immunological Reviews* 142(1):175-191.
- Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. 2009. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201.
- Kröger A, Köster M, Schroeder K, Hauser H, and Mueller PP. 2002. Review: Activities of IRF-1. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22(1):5-14.
- Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, and Lerner A. 1999. Cytokine profile in coeliac disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 49(4):441-446.
- Lahdenperä A, Ludvigsson J, Fälth-Magnusson K, Högberg L, and Vaarala O. 2011. The effect of gluten-free diet on Th1–Th2–Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 46(5):538-549.
- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Jemma C, Giovarelli M, and Cavallo G. 1988. Interferon-gamma is not an antiviral, but a growth-promoting factor for T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 18(4):503-510.
- Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, et al. 1993. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 23(9):2320-2325.
- Leivers C, Martin G, Gasparetto M, Shelley H, and Valente M. 2014. Coeliac disease. *Pediatrics and Child Health* 24(11):481-484.

- Li XR, Chong ASF, Wu J et al. 1999. Transcriptional Regulation of Fas Gene Expression by GA-binding Protein and AP-1 in T Cell Antigen Receptor·CD3 Complex-stimulated T Cells. *J Biol Chem* 274:35203-35210.
- Lionetti E, Gatti S, Pulvirenti A, and Catassi C. 2015. Celiac disease from a global perspective. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 29(3):365-379.
- Lionetti P, Breese E, Braegger CP, Murch SH, Taylor J, and MacDonald TT. 1993. T cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* 105(2):373–381.
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guernonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu FF, Randolph GJ, Rudensky AY, and Nussenzweig M. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324(5925):392–397.
- Liu K, Waskow C, Liu X, et al. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology* 8:578–583.
- Liu Y, and Janeway CA. 1990. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 172(6):1735–1739.
- Loda E, and Balabanov R. 2012. Interferon regulatory factor 1 regulation of oligodendrocyte injury and inflammatory demyelination. *Reviews in the Neurosciences* 23(2):145–152.
- Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, et al. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263(5143):89-92.
- MacRae VE, Wong SC, Farquharson C, and Ahmed SF. 2006. Cytokine actions in growth disorders associated with pediatric chronic inflammatory diseases (review). *International Journal of Molecular Medicine* 18(6):1011–1018.



- Madsen M, Møller HJ, Nielsen MJ, et al. 2004. Molecular Characterization of the Haptoglobin-Hemoglobin Receptor CD163: Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *Journal of Biological Chemistry* 279(49):51561-51567.
- Maiuria L, Ciaccic C, Raiaa V, Vaccaa L, Ricciardellia I, et al. 2001. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut* 48(3):418-424.
- Maloy KJ, and Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunol* 2:816-822.
- Manavalana JS, Hernandez L, Shaha JG, Konikkaraa J, et al. 2010. Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Human Immunology* 71(1):50-57.
- Marsh MN. 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small-intestine – a molecular and immunobiological approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterology* 102(1):330-354.
- Matta B, Song S, Li D, and Barnes BJ. 2017. Interferon regulatory factor signaling in autoimmune disease. *Cytokine* 98:15-26.
- Maynard CL, and Weaver CT 2008. Diversity in the contribution of interleukin- 10 to T- cell- mediated immune regulation. *Immunol Rev* 226(1):219-233.
- medical audit. *Arch Dis Child* 66(4):561.
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
- Meresse B, Malamut G, and Cerf-Bensussan N. 2012. Celiac Disease: An Immunological Jigsaw. *Immunity* 36(6):907-919.
- Mirkovitch J, Konig A, Sauter KS, et al. 2006. Single-cell analysis divides bovine monocyte derived dendritic cells into subsets expressing either high or low levels of inducible nitric oxide synthase. *Vet Immunol Immunopathol* 114(1-2):1–14.

- Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, et al. 1988. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54(6):903–913.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, and Uzé G. 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19(10):1069-1098.
- Monteleone G, Pender SL, Wathen NC, and MacDonald TT. 2001. Interferon-alpha drives T cell-mediated immunopathology in the intestine. *European Journal of Immunology* 31(8):2247-2255.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, and O'Garra A. 2001. Interleukin- 10 and the interleukin- 10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19:683-765.
- Nagata S, and Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267(5203):1449-1456.
- Nagata S. 1994. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1313):281-287.
- Nathan CF, and Hibbs JB. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology* 3(1):65–70.
- Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, et al. 1998. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 115(3):551–563.
- Ning S. 2014. Interferon regulatory factors and autoimmune diseases. *Journal of Medical*
- O'Garra A, and Vieira P. 2007. TH1 cells control themselves by producing interleukin- 10. *Nature Reviews Immunology* 7:425-428.
- Ossina NK, Cannas A, Powers VC et al. 1997. Interferon- $\gamma$  Modulates a p53-independent Apoptotic Pathway and Apoptosis-related Gene Expression. *J Biol Chem* 272:16351-16357.

- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15(6):3032-3040.
- Pagani S, Meazza C, Travaglini P, Moretta A, and Bozzola M. 2005. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *Eur Cytokine Netw* 16(1):65–69.
- Palladinetti P, Symonds G, and Dolnikov A. 2008. IRF1 (interferon regulatory factor 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 12(5):367-370.
- Passlick B, Flieger D, and Ziegler-Heitbrock HW. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74(7):2527–2534.
- Perera LP, and Waldmann TA. 1998. Activation of human monocytes induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(24):14308-14313.
- Perlman H, Pagliari LG, Georganas C, Mano T, Walsh K, and Pope RM. 1999. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 190(11):1679-1688.
- Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, et al. 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269(5521):245–247.
- Plugis NM, and Khosla C. 2015. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 29(3):503-521.
- Polfliet MM, Fabriek BO, Daniels WP, Dijkstra CD, and van den Berg TK. 2006. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 211(6-8):419-425.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, et al. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282(5388):480–483.

- Rawstron AC, Fenton JAL, Ashcroft J, et al. 2000. The interleukin-6 receptor alpha-chain (CD126) is expressed by neoplastic but not normal plasma cells. *Blood* 96(12):3880-3886.
- Riordan FA, and Davidson DC. 1991. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease and
- Ritter M, Buechler C, Kapinsky M, and Schmitz G. 2001. Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C. *Eur J Immunol* 31(4):999-1009.
- Rogersa AN, van Buren DG, Hedbloma E, Tilahunb ME, Telferab JC, and Baldwin CL. 2005. Function of ruminant  $\gamma\delta$  T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108(1-2):211-217.
- Romaldini CC, Barbieri D, Okay TS, Raiz R, and Cançado ELR. 2002. Serum Soluble Interleukin-2 Receptor, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Levels in Children with Celiac Disease: Response to Treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35(4):513-517.
- Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. 2013. INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Research* 41(D1):D1040–1046.
- Salvati VM, MacDonald TT, Blanco GD, Mazzarella G, Monteleone I, Vavassori P, Auricchio S, Pallone F, Troncone R, and Monteleone G. 2003. Enhanced expression of interferon regulatory factor-1 in the mucosa of children with celiac disease. *Pediatric Research* 54(3):312-318.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4):778-809.
- Saraiva M, and O'Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* volume 10:170-181.
- Savill, J. 2000. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res* 23(3-5):173-174.

- Schindler C. 1999. Cytokines and JAK-STAT signaling. *Experimental Cell Research* 253(1):7-14.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, and Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75(2):163–89.
- Serbina NV, and Pamer EG. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology* 7:311–317.
- Shen HH, Talle MA, Goldstein G, and Chess L. 1983. Functional subsets of human monocytes defined by monoclonal antibodies: a distinct subset of monocytes contains the cells capable of inducing the autologous mixed lymphocyte culture. *The Journal of Immunology* 130(2):698–705.
- Shoelson SE, Herrero L, and Naaz A. 2007. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* 132(6):2169-2180.
- Shtrichman R, and Samuel CE. 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Microbiology* 4(3):251-259.
- Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Müller, and Roers A. 2006. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* 36(12):3248-3255.
- Smith NL, and Denning DW. 2014. Clinical implications of interferon gamma genetic and epigenetic variants. *Immunology* 143(4):499-511.
- Spangelo BL, Judd AM, Call GB, Zumwalt J, and Gorospe WC. 1995. Role of the Cytokines in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and Gonadal Axes. *Neuro Immuno Modulation* 2(5):299-312.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, et al. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263(5143):92-95.

- Stahl N, Farrugella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE and Yancopoulos GD. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267(5202):1349-1353.
- Stamnaes JL, and Sollid M. 2015. Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. *Seminars in Immunology* 27(5):343-352.
- Suk K, Kim S, Kim YH, et al. 2001. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *The Journal of Immunology* 166(7):4481–4489.
- Sulahian TH, Hogger P, Wardwell K, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, et al. 2000. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* 12(9):1312-1321.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117(1):185–194.
- Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* 47:187–376.
- Trinchieri G. 2007. Interleukin- 10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 204(2):239-243.
- van Den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, et al. 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 66(5):858-866.
- van Furth R, and Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* 128(3):415–435.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, and Langevoort HL. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46(6): 845–852.

- van Furth R, Raeburn JA, van Zwet TL. 1979. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood* 54(2):485–500.
- Varol C, Mildner A, and Jung S. 2015. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology* 33:643-675.
- Vazquez H, Smecuol E, Flores D, Mazure R, Pedreira S, Niveloni S, Maurino E, and Bai JC. 2001. Relation between cigarette smoking and celiac disease: Evidence from a case-control study. *American Journal of Gastroenterology* 96(3):798-802.
- Villella A, Picard C, Jouanguy E, Dupuis S, Popko S, Abughali N, et al. 2001. Recurrent *Mycobacterium avium* osteomyelitis associated with a novel dominant interferon gamma receptor mutation. *Pediatrics* 107(4):1-3.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, and Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual Review of Immunology* 17:331-367.
- Wenzel I, Roth J, and Sorg C. 1996. Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells. *Eur. J. Immunol* 26(11):2758–2763.
- Wong SC, MacRae VE, McGrogan P, and Ahmed SF. 2006. The role of pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease growth retardation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43(2):144–55.
- Yu-Lee LY. 2001. Stimulation of interferon regulatory factor-1 by prolactin. *Lupus* 10(10):691–699.
- Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research* 57:435-455.
- Zembala M, Uracz W, Ruggiero I, et al. 1984. Isolation and functional characteristics of FcR<sup>+</sup> and FcR-human monocyte subsets. *The Journal of Immunology* 133(33):1293– 1299.

- Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, and Lo-Man R. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31(5):761-771.
- Zhao Y, Xiao X, Frank SJ, Lin HY, and Xia Y. 2014. Distinct mechanisms of induction of hepatic growth hormone resistance by endogenous IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307(2):E186–E198.
- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, et al. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23(9):2053–2058.
- Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Fingerle G, et al. 1991. Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. *Pathobiology* 59(3):127–130.
- Ziora K, Świder M, Mazur B, Oświęcimska J, Jachimowicz M, Matusik P, Małecka-Tendera E. 2013. Stężenia IL-6, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$  we krwi u dziewcząt z zaburzeniami odżywiania (jadłowstręt psychiczny kontra otyłość). *Pediatric Endocrinology* 3(44):31–46
- Zwadlo-Klarwasser G, Bent S, Haubeck H, Sorg C, and Schmutzler W. 1990. Glucocorticoid-Induced Appearance of the Macrophage Subtype RM 3/1 in Peripheral Blood of Man. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91(2):175-180.

Internetové odkazy:

URL 1 <<https://russellhavranekmd.com/gastrointestinal-conditions/celiac-disease>> citováno 29.04.2018