

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Endotoxiny sinicových
vodních květů – efekty
a mechanismy
netoxických
koncentrací in vitro**

Diplomová práce

KATEŘINA POSPÍCHALOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Šindlerová, Ph.D.

Ústav experimentální biologie
Imunologie

Brno 2023

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor:	Kateřina Pospíchalová Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Endotoxiny sinicových vodních květů – efekty a mechanismy netoxických koncentrací in vitro
Studijní program:	Experimentální biologie živočichů a imunologie
Studijní obor:	Imunologie
Vedoucí práce:	RNDr. Lenka Šindlerová, Ph.D.
Rok:	2023
Počet stran:	88
Klíčová slova:	sinice, lipopolysacharid, vodní květ, zánět, cytokiny, Caco-2, PBMC, THP-1, střevní epitel, Toll-like receptory

Bibliographic record

Author: Kateřina Pospíchalová
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Endotoxins of cyanobacterial water blooms – effects and mechanisms of non-toxic concentrations in vitro

Degree Programme: Experimental Animal Biology and Immunology

Field of Study: Immunology

Supervisor: RNDr. Lenka Šindlerová, Ph.D.

Year: 2023

Number of Pages: 88

Keywords: cyanobacteria, lipopolysaccharide, water bloom, inflammation, cytokines, Caco-2, PBMC, THP-1, intestinal epithelium, Toll-like receptors

Abstrakt

Sinice a sinicové vodní květy produkují biologicky aktivní látky, které mohou mít negativní vliv na lidské zdraví, ať už při vodních rekreačních aktivitách nebo při požití kontaminované vody. Tato expozice může u lidí vyvolat podráždění kůže, očí, nevolnosti, alergie a onemocnění gastrointestinálního traktu. Součástí buněčné stěny sinic i gramnegativních heterotrofních bakterií, které jsou významnou součástí vodních květů, jsou lipopolysacharidy (LPS). Zatím je však velmi málo známo o tom, jak jejich environmentální směsi, ale i LPS samotných sinic přispívají k výše zmíněným zdravotním komplikacím.

Tato práce je zaměřena na studium prozánětlivých efektů LPS izolovaných z vodních květů pocházejících z 19 rekreačních vodních ploch v České republice. Ke studiu byla použita kokultura diferencovaných Caco-2 buněk (enterocyty) a mononukleárních leukocytů izolovaných z lidské periferní krve. Byla sledována změna v produkci prozánětlivých cytokinů, exprese proteinů těsných spojů a aktivace monocytů. Byl prokázán prozánětlivý efekt LPS ze sinicových vodních květů s dominujícím druhem *Dolichospermum flos-aquae*.

Druhým cílem práce bylo připravit klony buněk THP-1 bez exprese funkčního Toll-like receptoru (TLR) 4 a 2, jejichž experimentální použití přispěje k popsání mechanismu působení sinicového LPS izolovaného z axenické laboratorní kultury sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905. V rámci diplomové práce se povedlo připravit 3 úspěšné THP-1^{TLR2-/-} klony. Jejich expozice studovanému LPS ukázala, že TLR-2 hraje velmi významnou roli v jeho signalizaci.

Součástí této práce je i literární rešerše zabývající se střevním epitelem, imunitním systémem střeva, buněčnými kulturami a v neposlední řadě sinicemi, lipopolysacharidem a vodními květy.

Abstract

Cyanobacteria and cyanobacterial water blooms produce biologically active substances that can have negative effects on human health, either during aquatic recreational activities or from ingestion of contaminated water. This exposure can cause skin and eye irritation, nausea, allergies, and gastrointestinal tract disease in humans. Lipopolysaccharides (LPS) are an important part of the cell wall of cyanobacteria and gramnegative heterotrophic bacteria that are important components of the water blooms. However, very little is known so far about how their environmental mixtures, as well as the LPS of cyanobacteria themselves, contribute to the above-mentioned health complications.

The present work is aimed at studying the pro-inflammatory effects of LPS isolated from water blooms originating from 19 recreational water bodies in the Czech Republic. Coculture of differentiated Caco-2 cells (enterocytes) and mononuclear leukocytes isolated from human peripheral blood was used for the study. Changes in pro-inflammatory cytokines production, tight junction proteins expression and monocytes activation were observed. The pro-inflammatory effect of LPS from cyanobacterial water blooms dominated by *Dolichospermum flos-aquae* was demonstrated.

The second aim of this work was to prepare THP-1 cell clones lacking expression of functional Toll-like receptor (TLR) 4 and 2, the experimental use of which will contribute to the description of the mechanism of action of cyanobacterial LPS isolated from axenic laboratory culture of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905. In the framework of the thesis, 3 successful THP-1^{TLR2-/-} clones were prepared. Their exposure to the studied LPS showed that TLR-2 plays a very important role in its signaling.

This work also includes a literature search dealing with the intestinal epithelium, the immune system of the intestine, cell culture and last but not least cyanobacteria, lipopolysaccharide and water blooms.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2022/2023

Ústav:	Přírodovědecká fakulta
Studentka:	Bc. Kateřina Pospíchalová
Program:	Experimentální biologie živočichů a imunologie
Specializace:	Imunologie

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Endotoxiny sinicových vodních květů – efekty a mechanismy netoxických koncentrací in vitro.
Název práce anglicky:	Endotoxins of cyanobacterial water blooms – effects and mechanisms of non-toxic concentrations in vitro.
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Studentka se zapojí do dlouhodobého výzkumu v oblasti prozánětlivých efektů lipopolysacharidů (LPS) environmentálních směsí sinicových vodních květů. Vzorky z biomas získaných z rekreačních ploch České republiky budou využity k ovlivnění společné kultury diferencovaných Caco2 buněk jako in vitro modelu lidského střevního epitelu a PBMC (peripheral blood mononuclear cells) získaných od zdravých dárců. Bude sledována produkce prozánětlivých cytokinů a aktivace imunitních buněk. Cílem této části práce je zmapovat prozánětlivý potenciál endotoxinů reálných environmentálních směsí a za pomoci analýz druhového složení biomas na spolupracujícím pracovišti doc. Babicy (RECETOX) případně vytipovat druhy sinic či bakterií, které by mohly indikovat zvýšené riziko pro lidské zdraví. Studentka se zároveň bude podílet na přípravě TLR4/- a TLR2/- klonů THP-1 buněk a jejich využití ke studiu mechanismu působení LPS sinice *Aphanizomenon flos-aquae*. Zadání práce vychází z dosavadních výsledků skupiny prokazujících bioaktivitu tohoto LPS v širokém spektru použitých buněčných modelů (keratinocyty, enterocyty, makrofágy) a naznačujících, že aktivace probíhá přes jiný než TLR4 receptor. Studijní plán: 1. semestr (podzim 2021) - studentka si osvojí práci s buněčnými kulturami, izolaci PBMC z plné krve, detekci pomocí metody ELISA a přípravu vzorků na vícebarevnou flowcytometrickou analýzu. Prakticky se zapojí do běžících experimentů. 2. semestr (jaro 2022) - předpokládané dokončení experimentů na kokulturách, vyhodnocení dat. Dále se studentka zapojí do zavádění přípravy klonů a jejich charakterizace - detekce exprese receptorů pomocí flow cytometrie a/nebo western blottingu. 3. semestr (podzim 2022) - experimenty studující mechanismus působení LPS *Aphanizomenon flos-aquae* za využití připravených klonů a zvládnutých metod buněčné a molekulární biologie. Zároveň bude vedena k přípravě diplomové práce - příprava osnovy a následně teoretické části DP. 4. semestr (jaro 2023) - dokončení experimentů, vyhodnocení dat, zpracování praktické části DP a diskuse, finální úpravy.

Literatura: Vašíček et al. 2020, Cyanobacterial lipopeptides puwainaphycins and minutissamides induce disruptive and pro-inflammatory processes in Caco-2 human intestinal barrier model. doi: 10.1016/j.hal.2020.101849

Moosová et al. 2019, Lipopolysaccharides from *Microcystis* Cyanobacteria-Dominated Water Bloom and from Laboratory Cultures Trigger Human Immune Innate Response. doi: 10.3390/toxins11040218

Kubíčková et al. 2019, Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2

Vedoucí práce:	RNDr. Lenka Šindlerová, Ph.D.
Datum zadání práce:	29. 10. 2021
V Brně dne:	11. 5. 2023

Bc. Kateřina Pospíchalová, 8. 11. 2021
RNDr. Lenka Šindlerová, Ph.D., 19. 11. 2021
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 22. 11. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 15. května 2023

.....
Kateřina Pospíchalová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce, RNDr. Lence Šindlerové, Ph.D., za ochotu, rady a trpělivost při vedení a zpracovávání diplomové práce. Velké díky patří i mým kolegyním Veronice a Petře za veškerý čas, rady, podporu, ochotu a neskutečnou trpělivost. Vždy byly nablízku, když jsem potřebovala poradit, pomoci i zachránit jak při práci v laboratoři, tak při vypracovávání této práce.

Závěrem bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia a v neposlední řadě při psaní této práce.

Moc děkuji.

Obsah

Seznam obrázků	17
Seznam tabulek	18
Seznam pojmů a zkratk	19
1 Úvod	21
2 Sinice	22
2.1 Stavba sinic.....	22
2.2 Lipopolysacharidy	24
2.3 Mechanismus působení LPS.....	25
3 Vodní květy	28
4 Gastrointestinální trakt	30
4.1 Slizniční imunita střeva	31
4.2 Těsné spoje.....	32
4.2.1 Claudiny	33
4.2.2 Occludin	33
4.2.3 Zonula occludens	33
5 Buněčné modely	35
5.1 Caco-2 buňky	36
5.2 PBMC.....	37
5.3 Kokultura	38
6 Příprava klonů	39
6.1 CRISPR-Cas systém.....	39
6.2 CRISPR-Cas9 s THP-1	40
6.3 Využití CRISPR-Cas systému.....	41
7 Cíle práce	42
8 Materiál a metody	43
8.1 Roztoky a média	43

8.2	Vzorky LPS sinicových vodních květů	46
8.3	Kultivace Caco-2 buněk	46
8.4	Izolace PBMC	47
8.5	Poskládání kokulturního modelu	48
8.6	ELISA.....	49
8.7	Western blot.....	51
8.7.1	Příprava vzorků	51
8.7.2	Příprava gelů.....	51
8.7.3	Elektroforéza	52
8.7.4	Přenos proteinů (blotting) a analýza	53
8.8	Průtoková cytometrie.....	54
8.8.1	Izolované buňky	55
8.8.2	Buňky po kultivaci	55
8.9	Selekce klonů	56
8.9.1	Testování odpovídavosti klonů TLR-4.....	56
8.9.2	Testování odpovídavosti klonů TLR-2.....	57
8.10	Sekvenace potenciálních klonů	57
8.10.1	Izolace chromozomů.....	57
8.10.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	58
8.10.3	Přečištění PCR produktu	59
8.10.4	Zaslání vzorků na sekvenaci	59
8.11	Statistika	60
9	Výsledky	61
9.1	Produkce cytokinů.....	61
9.2	Expres proteinů těsných spojů.....	63
9.3	Aktivace monocytů	64
9.4	Testování odpovídavosti KO klonů TLR-2 a TLR-4 na modelový ligand.....	66
9.5	Sekvenování	68
9.6	TLR-2 klony po expozici Ap1.....	72
10	Diskuze	74

11 Závěr	78
Literatura	79

Seznam obrázků

Obr. 1 Vnitřní stavba sinicové buňky.....	23
Obr. 2 Struktura lipopolysacharidu	24
Obr. 3 Signaliace TLR-4 a TLR-2.....	27
Obr. 4 Vliv sinicových toxinů na lidský GIT a slizniční vrozený imunitní systém.....	29
Obr. 5 Struktura stěny tenkého střeva	30
Obr. 6 Sestavení kokultury	38
Obr. 7 Western blot.....	53
Obr. 8 Produkce cytokinů	62
Obr. 9 Western blot analýza.....	63
Obr. 10 Stanovení exprese proteinů těsných spojů.....	64
Obr. 11 Gatovací strategie	65
Obr. 12 MFI CD16.....	66
Obr. 13 Produkce TNF α klony TLR-4 ^{-/-} a TLR-2 ^{-/-} po expozici modelovému ligandu. .	68
Obr. 14 Sekvence TLR-2 ^{-/-} klonů	70
Obr. 15 Sekvence potenciálních TLR4 ^{-/-} klonů získaných pomocí gRNA TLR-4 AB	71
Obr. 16 TLR-2 ^{-/-} klony po expozici Ap1	73

Seznam tabulek

Tab. 1 DMEM médium.....	43
Tab. 2 RPMI médium	43
Tab. 3 SDS lyzační pufr.....	43
Tab. 4 PBS+EDTA	44
Tab. 5 PBS	44
Tab. 6 Promývací pufr	44
Tab. 7 TBS-T.....	44
Tab. 8 Leamli pufr	45
Tab. 9 Elektroforetický pufr.....	45
Tab. 10 Transferový pufr	45
Tab. 11 THP-1 médium.....	45
Tab. 12 Přehled LPS sinicových vodních květů.....	46
Tab. 13 Rozdělovací gel	52
Tab. 14 Hřebínkový gel.....	52
Tab. 15 Sekvence gRNA	56
Tab. 16 Sekvence primerů	58
Tab. 17 Teplotní profil PCR.....	59

Seznam pojmů a zkratek

Ap1	–	LPS izolovaný z <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> PCC 7905
APS	–	amonium persulfát
BCA	–	bicinchoninic acid, bicinchoninová kyselina
BSA	–	bovine serum albumin, bovinní sérový albumin
CCL	–	chemokinový ligand 2 (C-C motiv)
CD	–	cluster od differentiation, diferenční skupina
CRISPR	–	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dNTP	–	deoxyribonukleosidtrifosfáty
DAMP	–	Damage associated molecular patterns
DMEM	–	Dublecco's Modified Eagle Medium
DNA	–	deoxyribonukleová kyselina
EC	–	LPS izolovaný z <i>Escherichia coli</i>
EDTA	–	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	–	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS LE	–	fetal bovine serum - low endotoxin
FWD	–	forward
GIT	–	gastrointestinální trakt
gRNA	–	guide RNA
HDR	–	homology directed repair
HKLM	–	heat-killed <i>Listeria monocytogenes</i>
Ig	–	imunoglobulin
IL	–	interleukin
KDO	–	keto-deoxyoktulosonát
KI	–	knock in
KO	–	knock out
LPS	–	lipopolysacharid
MD-2	–	myeloidní diferenční faktor-2

MyD88	–	myeloid differentiation primary response 88
n. d.	–	nedetekovatelné
NEAA	–	non-essential amino acid, neesenciální aminokyseliny
NHEJ	–	non-homology end joining
PAM	–	protospacer adjacent motif
PAMP	–	pathogen associated molecular patterns
PBMC	–	peripheral blood mononuclear cell
PBS	–	phosphate buffered saline
PCR	–	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PI	–	propidium iodide
PMSF	–	phenylmethylsulfonyl fluoride, fenylmetylsulfonyl fluorid
PVDF	–	polyvinylidene difluoride
RNA	–	ribonukleová kyselina
REV	–	reverse
RT	–	room temperature, pokojová teplota
SDS	–	sodium dodecyl sulfate, dodecylsulfát sodný
TBS-T	–	tris-buffered saline-Tween
TEMED	–	tetrametyletylendiamin
TGF	–	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TLR	–	toll-like receptor
TNF	–	tumor necrosis factor, tumor nekrotizující faktor
Treg	–	regulační T-lymfocyty
WR	–	working reagent, pracovní reagent
ZO	–	zonula occludens

1 Úvod

Sinice a sinicové vodní květy představují problém v rámci životního prostředí související s eutrofizací vod a globálním oteplováním. Se zvyšujícími se teplotami narůstá celosvětově oblast vzniku vodních květů, jejich intenzita i délka trvání. Tím se zároveň zvyšují i koncentrace biologicky aktivních látek produkovaných do prostředí. Při expozici těmto látkám v rekreačních vodách nebo při požití kontaminované pitné vody mohou mít negativní vliv mimo jiné na buňky střevní sliznice. Z buněčných stěn sinic, stejně jako heterotrofních gramnegativních bakterií, které jsou součástí vodního květu, jsou uvolňovány lipopolysacharidy (LPS). Prozánětlivé účinky bakteriálních LPS jsou dobře známy. Ovšem účinky a mechanismus působení sinicových LPS, stejně jako environmentálních směsí, jsou zatím málo prozkoumány.

Cílem této práce bude 1/ zjistit, zda LPS sinicových vodních květů mohou vyvolat zánět u buněk střevního epitelu a mít vliv na zdraví, a 2/ připravit THP-1^{TLR4}^{-/-} a THP-1^{TLR2}^{-/-} klony ke zjištění mechanismu působení LPS z axenické kultury sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905.

2 Sinice

Sinice, též známé jako cyanobakterie, jsou fotoautotrofní prokaryota, která se vyskytují téměř ve všech prostředích (Buratti *et al.*, 2017). Jedná se o jedny z nejstarších druhů organismů žijících na Zemi. Vznikly přibližně před 3 miliardami let (Huisman *et al.*, 2018) z anaerobních fotosyntetizujících bakterií (Maršálek, 2002). Patrně nejznámějším prostředím, ve kterém se vyskytují, jsou vodní plochy, kde vytvářejí vodní květy. Vzhledem k tomu, že mezi nejvýznamnější živiny ovlivňující jejich růst patří fosfor a dusík, je rozvoj vodních květů ve sladkých vodách významně podpořen eutrofizací vod, např. splachem hnojiv ze zemědělských půd (Herrero and Flores, 2008).

2.1 Stavba sinic

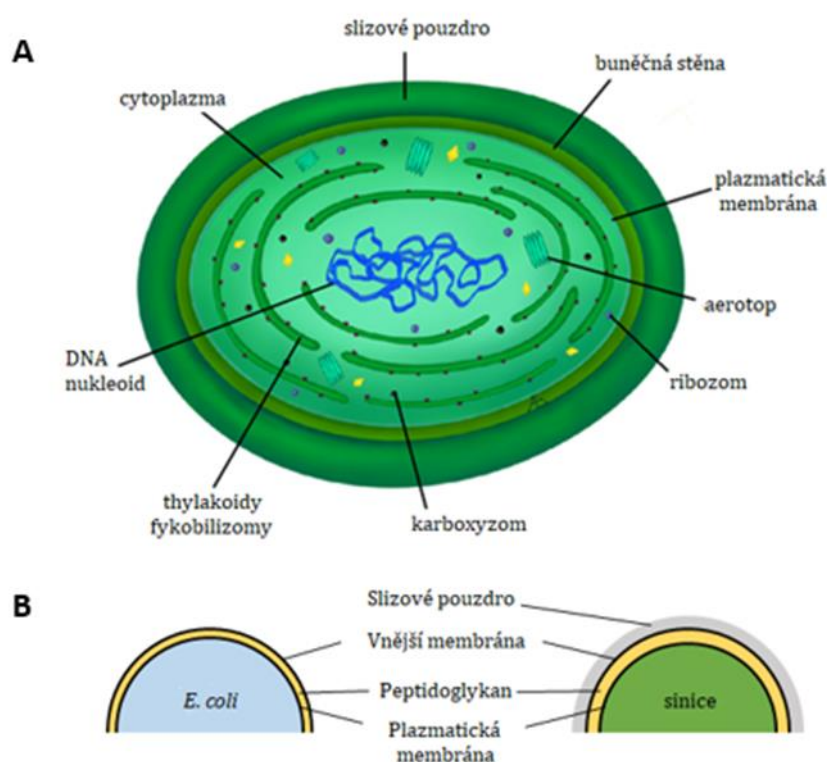
Velikost sinic se pohybuje v rozmezí 1–10 μm (Maršálek, 2002) a obvykle se vyskytují ve třech různých formách, buď jako jednotlivé buňky, nebo buňky tvořící vlákna, popřípadě jako kolonie (Kalina and Váňa, 2005).

Sinice, stejně jako gramnegativní bakterie, mají na svém povrchu dvě plazmatické membrány, vnitřní a vnější. Mezi těmito membránami se nachází vrstva mureinu. Murein, též známý jako peptidoglykan, je základní pevnou složkou buněčné stěny bakterií (Kalina and Váňa, 2005). Oproti gramnegativním bakteriím mají sinice výrazně silnější peptidoglykanovou vrstvu (Durai, Batool and Choi, 2015). Ve vnější membráně je několik druhů transportních kanálů, které umožňují přenos iontů přes stěnu, např. poriny (Kalina and Váňa, 2005). Kvůli složení buněčné stěny jsou sinice řazeny mezi gramnegativní bakterie, protože při Gramovu barvení získávají růžové zbarvení (Kalina and Váňa, 2005). Ovšem některé vlastnosti mají stejné s grampozitivními bakteriemi (Hoiczyk and Hansel, 2000).

Na vnější straně vnější membrány se nachází slizová vrstva, též nazývaná glykokalyx, která je složená z LPS. Ty jsou ukotvené ve vnější membráně sinic. Slizová vrstva má vláknitou strukturu. Tato vrstva bývá vyvinuta do různé míry, v některých

případech může tvořit silnou vrstvu kolem celé buňky. U sinic nejsou přítomny bičíky, ale některé sinice mají možnost aktivního pohybu (Kalina and Váňa, 2005). Konkrétně se jedná o sinice rodu *Oscillatoriales*, u kterých byl zaznamenán otáčivý pohyb (Hoiczyk, 2000). Při pohybu je produkováno množství slizu, který napomáhá klouzání i otáčivému pohybu (Kalina and Váňa, 2005).

Uvnitř sinicové buňky se nachází cytoplazma, ve které jsou ribozomy, DNA (nukleoid), thylakoidy, fykobilizomy, karboxyzom a aerotopy (viz obr. 1) (Kalina and Váňa, 2005). K fotosyntéze slouží thylakoidy a fykobilizomy (Strašková *et al.*, 2019).



Obr. 1 Vnitřní stavba sinicové buňky.

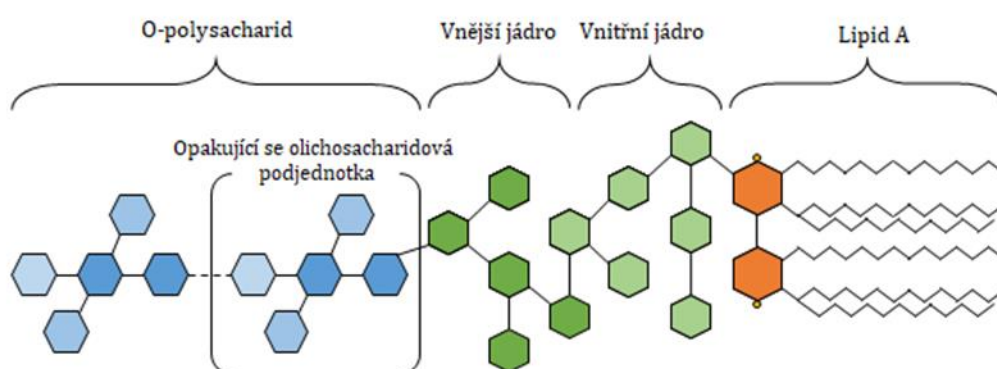
A: Obrázek vnitřní stavby sinicové buňky s popsány jednotlivými částmi (URL1), **B:** porovnání stavby povrchu *Escherichia coli* (*E. coli*) a sinicové buňky (Mehta, Evitt and Swartz, 2015), převzato a upraveno

2.2 Lipopolysacharidy

Jak už bylo uvedeno výše, LPS se nacházejí ve vnější membráně sinic a gramnegativních heterotrofních bakterií. LPS je makromolekula, která je složena z lipidu a polysacharidu spojených kovalentní vazbou. LPS se obecně skládá ze tří základních částí (viz obr. 2): lipidu A, O-polysacharidu a oligosacharidového jádra, které předchází dvě spojuje. Jádro je navíc rozdělené na dvě části, vnější a vnitřní (Durai, Batool and Choi, 2015).

Lipid A je složený ze dvou D-glukosaminových jednotek, ke kterým jsou připojeny acylové řetězce (Raetz *et al.*, 2009). Lipid A má hydrofobní povahu (Raetz and Whitfield, 2002) a ukotvuje molekulu LPS ve vnější membráně (Durai, Batool and Choi, 2015). Sinicové LPS se v porovnání s LPS gramnegativních heterotrofních bakterií liší ve struktuře lipidu A (Chorus and Welker, 2021). Hlavními rozdíly jsou počet a délka řetězců mastných kyselin (Durai, Batool and Choi, 2015).

Ve vnitřním jádru sinic často chybí heptózy a KDO (kyselina 3-deoxy-D-manno-oktulózónová, též ketodeoxyoktulózónová), které se běžně vyskytují ve vnitřním jádru LPS gramnegativních bakterií. Vnější jádro je středně variabilní a obsahuje hexózy a hexaminózy. O-polysacharid je složen z opakujících se cukerných podjednotek, je vysoce variabilní a je zodpovědný za specifitu LPS. (Erridge, Bennett-Guerrero and Poxton, 2002; Chorus and Welker, 2021).



Obr. 2 Struktura lipopolysacharidu
(Erridge, Bennett-Guerrero and Poxton, 2002), převzato a upraveno

2.3 Mechanismus působení LPS

Pokud dojde k rozpadu buňky, uvolní se LPS z vnější membrány. Bývá označován jako endotoxin (Durai, Batool and Choi, 2015). Jsou známy i tzv. exotoxiny, které jsou bakterií vypuzovány do okolního prostředí, aniž by došlo k rozpadu bakterie (King, 2006). LPS jsou rozpoznávány pomocí Toll-like receptorů (TLR), které jsou součástí vrozené imunity. Tyto receptory můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin - první skupina jsou TLR vázané na povrchu membrány buněk (TLR-1, -2, -4, -5, -6 a -10) a druhou skupinou jsou intracelulární TLR (TLR-3, -7, -8 a -9). První skupina TLR rozpoznává molekulární vzory patogenů (PAMP) a molekulární vzory spojené s poškozením (DAMP), zatímco skupina intracelulárních TLR (lokalizované v endozomu) rozpoznává mikrobiální a virovou nukleovou kyselinu (RNA, DNA) (Kawasaki and Kawai, 2014). Navázání specifických PAMP/DAMP na příslušné receptory vede k vytvoření dimerů (homodimery a heterodimery). Vytvořené dimery rekrutují adaptorové proteiny, čímž se následně aktivuje signální kaskáda, která spustí škálu zánětlivých odpovědí, ale vede i k iniciaci adaptivní imunitní odpovědi (Ullah *et al.*, 2016).

LPS *E. coli* je modelovým ligandem pro TLR-4. Síla vazby mezi TLR-4 a LPS je dána strukturou lipidu A (Chorus and Welker, 2021). Micely LPS jsou ze séra vychytávány pomocí LBP (LPS vazebný protein). Ten napomáhá extrakci jednotlivých molekul z micel pomocí CD14 proteinu, který je zakotvený v plazmatické membráně, ale může se vyskytovat i volně rozpuštěný (Ciesielska, Matyjek and Kwiatkowska, 2021). Komplex LPS/CD14 je pak transportován ke komplexu TLR-4/MD-2 (Myeloid Differentiation factor 2), kde se přes MD-2 váže k receptoru. Dochází k homodimerizaci dvou aktivovaných komplexů CD14/LPS/MD-2/TLR-4 a spuštění signální dráhy. Skrze adaptorové proteiny MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) nebo TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β) je indukovaná prozánětlivá odpověď (Chun and Seong, 2010).

Obě signální dráhy (MyD88 a TRIF, viz obr. 3) jsou důležité pro zahájení obrany proti patogenům (Durai, Batool and Choi, 2015). Dráha závislá na MyD88 je

zodpovědná za expresi prozánětlivých cytokinů, zatímco TRIF dráha (MyD88 nezávislá dráha) zprostředkovává produkci interferonů typu I (Ullah *et al.*, 2016).

V MyD88 závislé dráze se váže TIRAP (adaptorová molekula spojená s TLR) na TIR (doména receptoru Toll-IL-1) doménu TLR-4, čímž se spustí kanonická dráha (Durai, Batool and Choi, 2015). Po stimulaci MyD88 rekrutuje komplex IRAK (kináza spojená s receptorem IL-1). IRAK je aktivován fosforylací a poté asociován s TRAF6 (faktor asociovaný s receptorem TNF) (Takeda and Akira, 2004), což vede k následné aktivaci IRF (regulační faktor IFN) a TAK1 (transformační růstový β -komplex aktivované kinázy 1). Komplex TAK1 aktivuje IKK (komplex I κ B kináza) (Durai, Batool and Choi, 2015). Komplex IKK fosforyluje I κ B, což vede k degradaci proteinů a následné translokaci transkripčního faktoru NF- κ B, který řídí expresi prozánětlivých cytokinů (Lu, Yeh and Ohashi, 2008). Aktivovaný komplex TAK1 následně aktivuje také MAPK kinázu (mitogen-aktivující proteinkináza), což vede k signalizaci JNK (N-terminální kináza) a p38 a aktivaci transkripčního faktoru AP-1 (aktivátorový protein 1) (Durai, Batool and Choi, 2015).

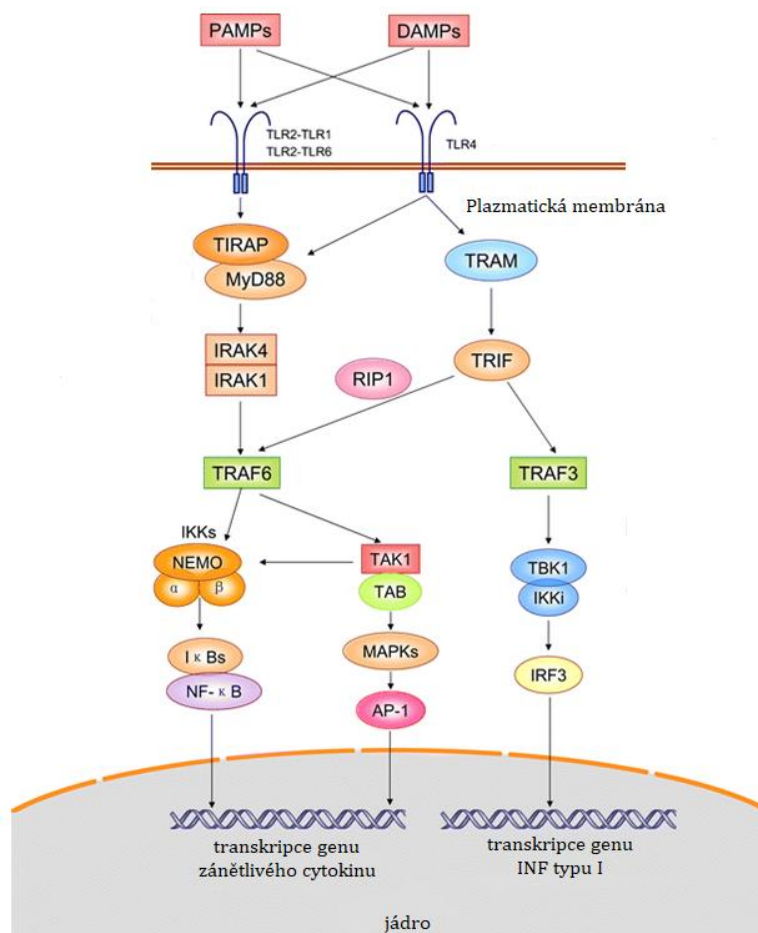
U TRIF dráhy (MyD88 nezávislá dráha) se TRAM (adaptérová molekula asociovaná s TRIF) váže na TIR domény TLR-4, což vede k postupnému získávání TRIF, TRAF6 a TRAF3. TRAF6 využívá RIP-1 (receptor interagující protein 1) k aktivaci komplexu TAK1 (Durai, Batool and Choi, 2015). Studie od Häcker *et al.* naznačuje, že TRIF stimuluje TRAF3 k aktivaci IRF3 (interferonový regulační faktor 3) (Häcker *et al.*, 2006). TRAF3 může asociovat s TBK1 (kináza vázající TANK1), TANK (aktivátor NF- κ B spojený s TRAF) a komplexem IKK. TBK1 a IKK jsou důležité pro dimerizaci a translokaci IRF3. IRF3 spolu s NF- κ B aktivují transkripci cílových genů, např. interferonů typu I (Lu, Yeh and Ohashi, 2008).

TLR-4 je důležitou složkou vrozené imunity, nadměrná aktivace však může vést k zánětlivým onemocněním. Pomocí různých inhibitorů, jako je např. lipid IVa a eritoran, lze blokovat TLR-4 a zabránit jeho dimerizaci. Lipid IVa je derivát lipidu A aktivního LPS získaný redukcí počtu acylových řetězců mastných kyselin. Oproti

antagonistické aktivitě lipidu IVa u lidí vůči komplexu TLR-4/MD-2, je u myší tato aktivita opačná a lipid IVa působí jako agonista. (Durai, Batool and Choi, 2015).

Molekuly LPS lze extrahovat ze široké škály sinic, ovšem ne všechny musí vykazovat agonistickou aktivitu (Macagno *et al.*, 2006). LPS extrahované ze sinice rodu *Spirulina* působí protizánětlivě a antioxidačně, a jsou antagonisty TLR-4 (Gault and Marler, 2009). Struktura sinicového LPS je podobná struktuře bakteriálního LPS, sinicový LPS je ovšem o řád méně toxický než LPS gramnegativních bakterií (Macagno *et al.*, 2006).

Je známo, že i receptor TLR-2 dokáže rozpoznat LPS gramnegativních bakterií. TLR-2 tvoří heterodimer s TLR-6, popřípadě TLR-1, a následně TLR-2 spouští pouze MyD88 závislou dráhu (viz obr. 3) (Durai, Batool and Choi, 2015).



Obr. 3 Signaliace TLR-4 a TLR-2
(Liu *et al.*, 2014), převzato a upraveno

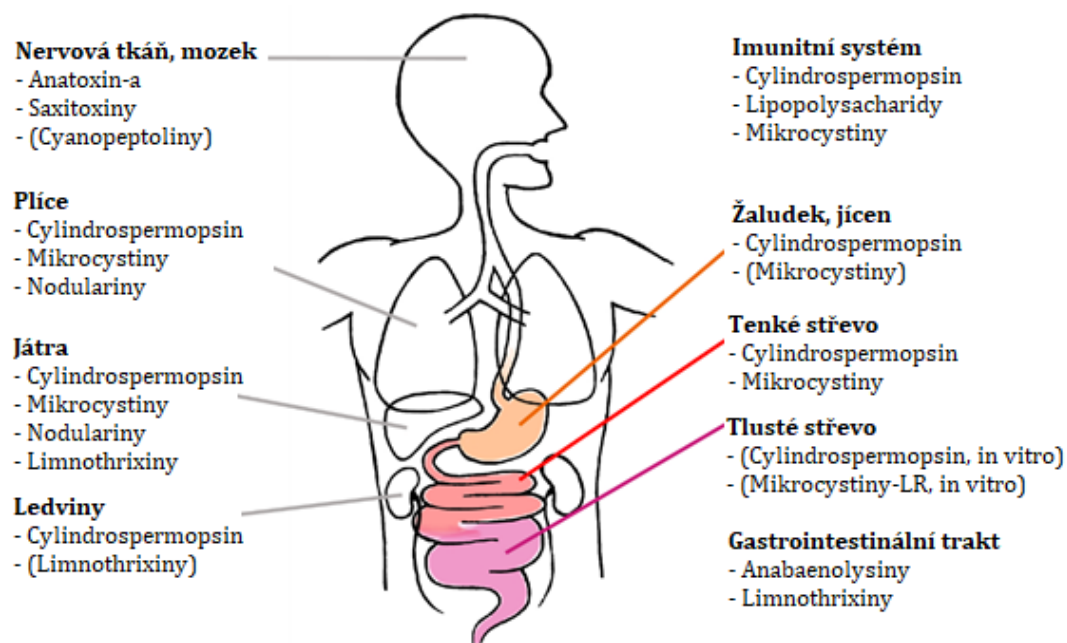
3 Vodní květy

Vodní květy jsou společenství přemnožených heterotrofních bakterií, řas a především sinic. Vyskytují se na hladině málo tekoucích až stojatých sladkovodních ploch (Znachor, 2005), mohou se tvořit i v mořských vodách a oceánech (Huisman *et al.*, 2018). V našem podnebí se vodní květy objevují nejčastěji v období od května do října, s maximem na přelomu srpna a září. Podíl na vzniku vodního květu má nejen teplota vody a sluneční záření, ale i obsah kyslíku a oxidu uhličitého ve vodě a pH vody (Komárková, 2014). Důležitým faktorem je i eutrofizace vody, což je obohacení vody množstvím minerálních živin, především fosforečnany a dusičnany (Chorus and Welker, 2021). Dalšími příčinami eutrofizace vody jsou anorganická hnojiva (Znachor, 2005) a globální oteplování (Huisman *et al.*, 2018).

Vodní květy jsou problémem v rámci životního prostředí (He *et al.*, 2016) a ekotoxikologie. Vodní květy zhoršují fungování ekosystémů, kvalitu rekreačních vod a kvalitu pitné vody. Mezi dominantní kmeny sinic zastoupených ve sladkovodních vodních květech patří sinice rodů *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Microcystis* a *Planktothrix* (Huisman *et al.*, 2018). Tyto druhy sinic produkují toxiny, tzv. cyanotoxiny, a další biologicky aktivní molekuly (sekundární metabolity), jako např. mikrocystin a cylindrospermopsin (Buratti *et al.*, 2017). Mikrocystin patří mezi nejrozšířenější cyanotoxiny v životním prostředí, v biomase vodních květů se nachází ve vysokém množství (Bláha, Babica and Maršálek, 2009) a napadá zejména játra (Komárková, 2014). Odhaduje se, že až 75 % sladkovodních sinicových vodních květů je toxických (Znachor, 2005).

Nadměrná expozice těmto toxinům má špatný dopad na lidské zdraví, ale i na zvířata. Jsou známy případy úhynu hospodářských i divokých zvířat po požití cyanotoxinů (Breinlinger *et al.*, 2021). U lidí je známo jen několik málo případů smrtelných otrav po akutní expozici cyanotoxinům (Buratti *et al.*, 2017). U člověka mají cyanotoxiny po akutní či chronické expozici negativní vliv především na játra, plíce, nervovou tkáň, ledviny a gastrointestinální trakt (GIT), viz obr. 4 (Kubickova *et al.*,

2019). Chronické vystavení kontaminované vodě bývá spojeno s rakovinou jater či jiným chronickým onemocněním jater. V ojedinělých případech souvisí chronická expozice kontaminované vodě i s rakovinou tlustého a tenkého střeva (Kubickova *et al.*, 2019).



Obr. 4 Vliv sinicových toxinů na lidský GIT a slizniční vrozený imunitní systém.

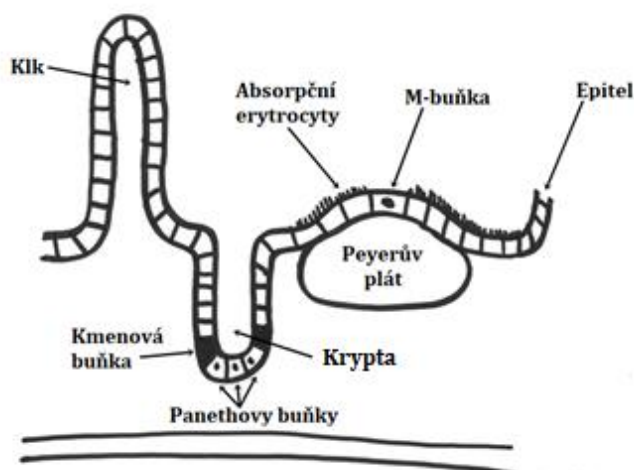
V levé části obrázku jsou orgány považované za cíle toxicity. V pravé části obrázku jsou orgány, které jsou přímo vystavené orální expozici. (Kubickova *et al.*, 2019), převzato a upraveno

Otravy bývají způsobené konzumací nedostatečně upravené povrchové vody, často po algicidním ošetření. Po tomto ošetření se uvolní intracelulární toxické metabolity z buněk do vody. Ke kontaktu s kontaminovanou vodou dochází i při vodních sportech a dalších rekreačních aktivitách. Voda může být vdechnuta nebo požitá nebo může dojít ke kontaktu vody s očima. V případech závažné expozice může dojít ke gastrointestinálním potížím. Tyto problémy zahrnují zejména bolesti břicha, průjemy, nevolnosti a zvracení (Kubickova *et al.*, 2019). Tyto potíže může způsobit např. i požití kontaminovaného jídla (URL2).

4 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt (GIT) se skládá z dutiny ústní, hltanu, jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva. Povrch dutiny ústní jen složen z mnohvrstevného dlaždicového epitelu a víceřadého cylindrického epitelu. Hltan a jícen obsahují nerohovatější vícevrstevný dlaždicový epitel. Povrch žaludku, tenkého a tlustého střeva je tvořen jednovrstevným cylindrickým epitelem (Konrádová, Uhlík and Vajner, 2000; Čihák, 2004).

Ve stěně tenkého střeva se nacházejí četné výběžky nazývané klky, mezi kterými se nacházejí prohlubně označované jako krypty (viz obr. 5). Tímto uspořádáním se zvětšuje slizniční povrch. Ve stěně sliznice jsou přítomny enterocyty, pohárkové buňky, endokrinní a Panethovy buňky, kmenové buňky a M buňky (Konrádová, Uhlík and Vajner, 2000; Čihák, 2004).



Obr. 5 Struktura stěny tenkého střeva (URL3), převzato a upraveno

První bariérou, kterou musí metabolity sinic překonat po orální expozici, je gastrointestinální epitel. S GIT je úzce spojen imunitní systém, který může vyvinout zánětlivou reakci v odpovědi na antigeny. Na udržení homeostatické rovnováhy

prostředí se podílí střevní epitel, lymfoidní tkáň spojené se střevem a mikrobiom. GIT spolupracuje s imunitním systémem na eliminaci patogenů (Kubickova *et al.*, 2019).

4.1 Slizniční imunita střeva

Podél celého střeva se nachází lymfatická tkáň, která bývá označována jako GALT (gut-associated lymphoid tissue). Na povrchu epitelu se nachází hlen obsahující glykoproteiny, které chrání epiteliální buňky. Epitel lze ovšem překonat, a tudíž je potřeba bariérovou funkci doplňovat obrannými mechanismy, které zajišťují molekuly a buňky slizničního imunitního systému (Murphy and Weaver, 2016).

Povrchy sliznic jsou chráněny vysoce vyvinutým a specializovaným slizničním lymfoidním systémem, který obsahuje imunologicky aktivní buňky (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2002). V kryptách se nacházejí Panethovy buňky (obr. 5) a produkují antibakteriální molekuly. Imunitní odpověď na antigeny přítomné ve střevě probíhá v Peyerových placích, ve kterých se nacházejí B-lymfocyty a makrofágy (Murphy and Weaver, 2016).

Mezi čtyři hlavní úlohy slizničního imunitního systému patří: ochrana před škodlivými patogeny (antiinfekční úloha), zabránění proniknutí infekčních antigenů ze sliznic do cirkulace (bariérová funkce), nízká reaktivita na neškodné antigeny na slizničních površích (slizniční tolerance) a udržování slizniční homeostázy (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2002).

Důležitou roli v udržení homeostázy a odpovědi na přítomnost patogenů mají cytokiny, což jsou regulátory imunitního systému. Cytokiny mohou být produkovány různými buňkami, jak imunitními, tak epiteliálními. Cytokiny můžeme rozdělit podle jejich funkce na prozánětlivé, protizánětlivé, cytokiny s aktivitou růstových faktorů a cytokiny uplatňující se v humorální a buněčné imunitě (Hořejší, 2017).

Cytokin tumor růstový faktor-beta (TGF- β) a kyselina retinová se ve střevě podílejí na diferenciaci T-regulačních buněk (Treg), které jsou do určité míry zodpovědné za homeostatickou rovnováhu (Kubickova *et al.*, 2019). K rozvoji zánětu ve střevě mohou přispět tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF α), interleukin (IL) 1

a IL-8, které jsou produkovány fagocytyujícími buňkami po rozpoznání patogenních vzorů (Kubickova *et al.*, 2019). Cytokiny IL-6, IL-10 a TGF- β mohou na imunokompetentní buňky působit buď stimulačně nebo supresivně (Parlesak *et al.*, 2004).

Střevními makrofágy, které jsou přisedlé ve střevní sliznici, je ve vysoké míře produkován protizánětlivý cytokin IL-10. (Murphy and Weaver, 2016). Imunitní systém je uzpůsoben tak, aby nereagoval na komenzální mikroflóru v lumen střeva, ale pokud tyto mikroorganismy nebo jejich metabolity proniknou přes epiteliální bariéru, je spuštěna silná imunitní reakce (Kubickova *et al.*, 2019).

4.2 Těsné spoje

Funkce epiteliální bariéry je zajištěna řadou mezibuněčných spojení, mezi která patří těsné spoje a desmozomy. Těsné spoje se vyskytují na rozhraní mezi apikální a bazolaterální doménou plazmatické membrány buněk (Luissint, Parkos and Nusrat, 2016). Těsné spoje se skládají ze dvou funkčních kategorií proteinů, z integrálních transmembránových proteinů tvořících síť mezi sousedními buněčnými membránami a z proteinů periferní membrány. Mezi integrální transmembránové proteiny jsou řazeny claudiny a occludin. Mezi periferní membránové proteiny patří zonula occludens (ZO) 1, ZO-2 a ZO-3. Tyto proteiny fungují jako můstky pro připojení integrálních membránových proteinů k cytoskeletu. Hladiny exprese a fosforylace proteinů těsných spojů mají rozhodující roli v regulaci funkce bariéry (Lee, Moon and Kim, 2018). Některé studie ukazují, že LPS zodpovídají za narušení těsných spojů (Siliciano and Goodenough, 1988; Tang *et al.*, 2018; He *et al.*, 2019).

Při slizničním zánětu často bývá snížena exprese proteinů těsných spojů. V některých studiích bylo prokázáno, že *in vitro* expozice epiteliálních buněk TNF α a IFN γ snižuje hladiny proteinů ZO-1, occludinu a E-kadherinu (Mankertz *et al.*, 2000; Naydenov *et al.*, 2013). Jedním z mechanismů přispívajících k netěsné střevní bariéře je přepínání exprese claudinů. Tento mechanismus snižuje expresi těsných claudinů,

jako jsou claudiny 4 a 7, a zvyšuje expresi prosakujících claudinů, tedy claudinu 2 a 15 (Luissint, Parkos and Nusrat, 2016).

4.2.1 Claudiny

Claudiny jsou transmembránové proteiny těsných spojů, které se nacházejí mezi plazmatickými membránami dvou sousedních buněk (Krause *et al.*, 2008). Claudiny se skládají ze dvou extracelulárních smyček a čtyř transmembránových domén. Rodinu claudinů tvoří celkem 23 proteinů (Lee, Moon and Kim, 2018). Claudiny mají schopnost regulovat propustnost pórů těsných spojů skrze paracelulární kanály. Na základě vlivu na propustnost epitelu můžeme claudiny rozdělit na ty, které zvyšují těsnost bariéry, neboli těsné claudiny (claudin 1, 3, 4 a 18), a ty, které přispívají ke zvýšené paracelulární permeabilitě, tedy prosakující claudiny (claudin 2, 10 a 15). Různé claudiny se nacházejí exprimované na rozdílných místech podél délky GIT. Claudiny 2, 10 a 15 jsou nejčastěji exprimovány v základně krypty, zatímco claudiny 3 a 4 jsou exprimovány na lumenálnímu povrchu (Luissint, Parkos and Nusrat, 2016).

4.2.2 Occludin

Occludin je vysoce exprimován na místech kontaktu buněk a je důležitý při sestavení a udržování těsných spojů. Tento protein se podobně jako claudiny skládá ze dvou extracelulárních smyček a čtyř transmembránových domén. Pro funkci occludinu je důležitá fosforylace. Při vysoké míře fosforylace bývá lokalizován v membráně, zatímco pokud je occludin fosforylován méně, nachází se v cytoplazmě. Fosforylace pravděpodobně řídí i interakci s jinými proteiny, jako je ZO-1. Fosforylovaný occludin reguluje stabilitu a propustnost těsných spojů (Lee, Moon and Kim, 2018).

4.2.3 Zonula occludens

Proteiny zonula occludens (ZO), které zahrnují ZO-1, ZO-2 a ZO-3, byly prvními specifickými proteiny těsných spojů, které byly objeveny. Tyto proteiny spojují occludin a claudin s aktinovým cytoskeletem. Tyto proteinové interakce udržují tvorbu a funkci těsných spojů. Dodnes nejsou zcela pochopeny role proteinů ZO. Studie

naznačují, že ačkoli buňky s deficitem ZO-1 mohou udržovat strukturu těsných spojů a vykazovat normální permeabilitu, aktivita jiných proteinů těsných spojů, jako jsou claudiny a occludin, při sestavování těsných spojů byla v těchto buňkách opožděna (Tsukita *et al.*, 2009; Lee, 2015). Též bylo zjištěno, že nedostatek ZO-2, popřípadě ZO-3, nemá vliv na tvorbu těsných spojů v epiteliálních buňkách. Toto naznačuje, že proteiny ZO-1 mají důležitější roli v kontrole sestavování těsných spojů v porovnání s dalšími dvěma zmíněnými proteiny (Lee, Moon and Kim, 2018).

5 Buněčné modely

Buněčné *in vitro* kultury slouží k pochopení mechanismů, které jsou základem *in vivo* buněčného chování (Duval *et al.*, 2017). K provedení různých experimentů lze použít buňky ze zavedených tkáňových kultur uložených v buněčných bankách nebo přímo z materiálu od dárce. Tyto primární buňky mají ovšem krátkou životnost a často bývá problém s jejich izolací, protože organismy obsahují různé typy populací buněk a je obtížné izolovat pouze konkrétní populaci nebo jeden typ buněk. Jedna z alternativních možností je použít zavedené buněčné linie. Ve výzkumu se běžně využívají buněčné linie odvozené z rakovinných buněk. Kultivaci buněk lze provádět za adherentních podmínek, za kterých jsou buňky přisedlé ke dnu misky, nebo v suspenzi, která např. u kultury lymfocytů více odpovídá přirozenému prostředí (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Mezi nejčastěji používané typy buněčných kultur patří 2D modely, ale v posledních letech i 3D modely. Co se týče 2D kultur, tak v nich buňky rostou a vytvářejí monovrstvu na dně misky, popřípadě v kultivační lahvi (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Proliferace buněk je umožněna díky přístupem živin a růstových faktorů přítomných v médiu. Výhodou 2D kultur je jednoduchost a levná údržba buněčné kultury (Duval *et al.*, 2017). 2D kultury mají i své nevýhody. Jednou z nich je, že 2D kultivované buňky nenapodobují přirozené struktury tkání. Po izolaci buněk z tkání a přenosu do 2D podmínek se změní morfologie buněk. Tím dojde ke ztrátě různorodého fenotypu a ovlivnění jejich funkce. Další nevýhodou je neomezený přístup k médiu a dalším složkám, jako je kyslík. Adherentní monokultury umožňují studium pouze jednoho typu buněk. Díky těmto nevýhodám je v určitých typech experimentů zapotřebí použít alternativní modely, jako jsou 3D buněčné modely (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Jedna z prvních 3D kultur byla vyrobena už v 70. letech v roztoku měkkého agaru. 3D kultury se využívají zejména u nádorových sféroidů, což jsou shluky buněk, které nepřilnou k povrchu a mají sférický tvar. Díky této technice se mnohem lépe napodobuje přirozené prostředí tumoru. V porovnání s 2D buněčnými kulturami mají

3D systémy horší životnost, opakovatelnost a komfort práce. Nevýhodou 3D kultur je náročná separace jednotlivých buněk ze sféroidních struktur, která trvá v rámci hodin až dnů. Často se zdůrazňuje skutečnost, že sféroidy mohou vznikat z několika buněčných shluků, nikoli z jedné buňky. Nicméně i tyto agregáty mají 3D formu a zdají se být lepším modelem než adherentní buňky (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Další variantou kultivace jsou tzv. kokultury, kdy jsou zároveň kultivovány dva a více buněčných typů. Kokultury lze rozdělit na přímé a nepřímé. V přímých kokulturách jsou společně kultivovány různé typy buněk. Příkladem přímé kokultury je studie Lehner *et al.*, kde společně kultivovali Caco-2 buňky s HT29-MTX buňkami a makrofágy s dendritickými buňkami (Lehner *et al.*, 2020). V nepřímých kokulturách jsou buňky odděleny fyzickou bariérou. Příkladem nepřímé kokultury je tato práce, tedy Caco-2 buňky a mononukleární buňky periferní krve (PBMC) oddělené polopropustnou membránou. Oba typy kokultur lze provádět jak na 2D modelech, tak na 3D (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

5.1 Caco-2 buňky

Jako model lidského GIT (střevních buněk) se používá např. buněčná linie Caco-2 buněk (Kubickova *et al.*, 2019). Caco-2 buňky jsou heterogenní buněčná linie pocházející z kolorektálního adenokarcinomu, která je široce používána jako model střevní epiteliální bariéry. Tato buněčná kultura má schopnost spontánně diferencovat do buněk tvořících konfluentní monovrstvu (Lea, 2015). Po diferenciaci buněk se tvoří mikrokly, desmozomy, těsná spojení a exprimují se enzymy membrány kartáčového lemu (Parlesak *et al.*, 2004). Buňky se tedy podobají vlastnostmi enterocytům, které se nacházejí v tenkém střevě. Vzhledem k heterogenitě buněk se mohou lišit jejich vlastnosti, tím pádem se mohou lišit nároky na kultivační podmínky subpopulací buněk. Model Caco-2 buněk má několik výhod, mezi které patří jednoduchost a reprodukovatelnost. Caco-2 buňky se 21 dní kultivují na inzertech s porézní membránou, během kterých diferencují a vytvoří polarizovanou monovrstvu. Ve

srovnání s normálním střevním epitelem má Caco-2 model jistá omezení, protože v normálním epitelu se nachází více než jeden typ buněk (Lea, 2015).

5.2 PBMC

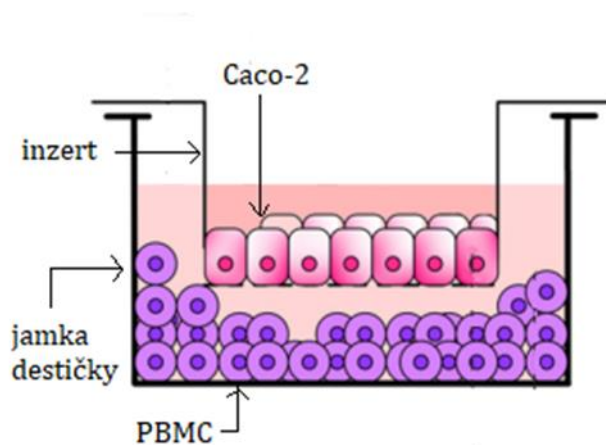
Lidské PBMC jsou buňky, které nemají segmentované jádro (Kleiveland, 2015). Jedná se o lymfocyty (T-, B- a NK buňky) a monocyty (Betsou *et al.*, 2019). Většina těchto buněk jsou klidové buňky bez efektorových funkcí. Naivní T-lymfocyty se nikdy předtím nesetkaly s antigenem. Po rozpoznání antigenu se naivní buňky aktivují, diferencují a vyvine se efektorová funkce. Aktivované T-lymfocyty se mohou diferencovat na paměťové T-lymfocyty, které jsou schopny vyvolat rychlejší a silnější imunitní odpověď po opětovném setkání s antigenem. B-lymfocyty se též nacházejí v krvi jako naivní s povrchově ukotveným antigenním receptorem. Po rozpoznání antigenu se mění na plazmatickou buňku produkující protilátky (Kleiveland, 2015). Monocyty po setkání s antigenem diferencují na makrofágy, které odstraňují patogeny, mrtvé buňky a iniciují adaptivní imunitu (Boyette *et al.*, 2017).

Frekvence lymfocytů v periferní krvi se specifitou pro jeden antigen je nízká. Pro stimulaci *in vitro* se používají polyklonální aktivátory, jako např. mitogenní lektiny, proteiny vázající sacharidy a glykoproteiny. Mezi nejčastější mitogenní lektiny patří LPS, které indukují proliferaci a aktivaci B-lymfocytů a monocytů. Účinky na imunitní funkci PBMC se obvykle zkoumají měřením změn proliferace lymfocytů a monocytů, sekrecí cytokinů a změn v genové expresi (Kleiveland, 2015).

PBMC se často izolují z periferní antikoagulované krve zdravých dárců (Betsou *et al.*, 2019) nebo z „buffy coatu“, což je bílá vrstva leukocytů v plné krvi, která se vytvoří po centrifugaci. Výhodou PBMC je, že jsou snadno dostupným zdrojem lidských imunitních buněk. Omezením konkrétně při studiu střevní imunity jsou fenotypové rozdíly mezi imunitními buňkami střevní sliznice a periferními mononukleárními buňkami (Kleiveland, 2015).

5.3 Kokultura

K udržení střevní homeostázy je důležitá vyvážená komunikace mezi imunitními buňkami, buňkami střevního epitelu a střevní mikrobiotou (Kleiveland, 2015). Pomocí systému kokultivace je umožněno porozumění mechanismům zapojených do komunikace mezi buňkami imunitního systému a epiteliálními buňkami. Uspořádání společné kultury (viz obr. 6) umožňuje i studium obou buněčných populací (Babini *et al.*, 2018). Kokultura je složená z konfluentní vrstvy diferencovaných enterocytů (tedy Caco-2 buněk), jež odděluje apikální kompartment od bazolaterálního kompartmentu s PBMC (Parlesak *et al.*, 2004). Apikální a bazolaterální póly Caco-2 buněk jsou odděleny důsledkem přítomnosti adhezivních molekul vytvářejících těsná spojení (Babini *et al.*, 2018). Monovrstva Caco-2 buněk je pro makromolekuly a bakteriální produkty, jako jsou třeba endotoxiny, zcela nepropustná nebo je její propustnost zanedbatelná (Parlesak *et al.*, 2004).



Obr. 6 Sestavení kokultury

Na schématu je kokultura z Caco-2 buněk a PBMC (Kordulewska *et al.*, 2020), převzato a upraveno

6 Příprava klonů

6.1 CRISPR-Cas systém

CRISPR-Cas systém je adaptivní imunitní systém prokaryot, který zajišťuje rezistenci vůči cizím genetickým elementům (Barrangou *et al.*, 2007). CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) lokus v genomu bakterií obsahuje spacer sekvence (neopakující se krátké sekvence) a repetice. Spacer sekvence nesou informaci o sekvenci cizorodé nukleové kyseliny, se kterou se daný organismus již v minulosti setkal. Tyto sekvence jsou také často nazývány small guide RNA (sgRNA) a u přípravy geneticky modifikovaných organismů (GMO) guide RNA (gRNA). Délka spacer sekvence se pohybuje kolem 17-84 nukleotidů. Repetice jsou obvykle dlouhé 18-50 nukleotidů (Marraffini and Sontheimer, 2010; Gupta *et al.*, 2019). V blízkosti CRISPR lokusu se nachází gen pro Cas nukleázu, a to ve vícero kopiích. Systém CRISPR-Cas je rozdělen do tří skupin na základě fylogeneze, sekvence a organizace lokusu (Gupta *et al.*, 2019). Ve výzkumu se nejčastěji používají Cas nukleázy skupiny II, do které patří Cas9 (Moore, 2015). Pro aktivitu Cas9 je nutno spacer navázat na nukleázu pomocí trans-activating crRNA (tracrRNA) (Liao and Beisel, 2021).

Cas9 nukleáza funguje jako genetické nůžky a byla objevena ve *Streptococcus pyogenes* (Moore, 2015). Pro aktivaci nukleázy je nutná komplementární vazba gRNA na cílovou nukleovou kyselinu, ale i vazba na PAM (protospacer adjacent motif). PAM je 3 nukleotidy dlouhá sekvence v cílové molekule, na kterou se váže nukleáza pomocí PAM-interagující domény. Cas9 následně vytvoří dvouřetězcový zlom v cílové nukleotidové kyselině několik nukleotidů za PAM (Gupta *et al.*, 2019; Khouzam and Tivakaran, 2021). Z tohoto důvodu je CRISPR-Cas systém využíván v genovém inženýrství. V eukaryotech je dvouřetězcový zlom opraven dvěma mechanismy: homologicky řízenou opravou (HDR) nebo nehomologním spojováním řetězců (HNEJ). U HDR bývá sekvence DNA opravena pomocí homologní sekvence DNA jako templátu. Opravy mechanismem HDR jsou využívány pro získ knock-in (KI) buněčných linií. Během opravného mechanismu dojde k vložení námi zvolené sekvence v místě

dvouřetězcového zlomu. U opravy mechanismem NHEJ jsou volné konce znovu spojeny díky nehomologickým sekvencím DNA. Následkem této opravy dojde buď k posunu čtecího rámce a tím tvorbě mutantního proteinu, nebo se v sekvenci objeví stop kodon a translace mRNA se v daném místě zastaví. Díky tomu může dojít k úplnému umlčení genu a tím vzniku knock-out (KO, -/-) buněčné linie (Gupta and Shukla, 2017; Deyell, Ameta and Nghe, 2019; Gupta *et al.*, 2019).

6.2 CRISPR-Cas9 s THP-1

Plazmid nesoucí Cas nukleázu a gRNA se vkládá již rutinními metodami jako jsou elektroporace nebo mikroinjekce (Khouzam and Tivakaran, 2021). V experimentální části této práce se pro sledování mechanismu signalizace připravovala KO THP-1 buněčná linie. THP-1 je buněčná linie, která se ve funkčních i morfologických vlastnostech podobá monocytům a makrofágům. THP-1 buňky byly izolované z pacienta trpícího akutní monocytární leukémií. Jsou využívány ke studiu imunitních reakcí. V porovnání s PBMC mají THP-1 buňky pro experimentální práci řadu výhod, mezi které patří rychlost proliferace buněk, snadné a bezpečné používání, kultivace buněk až 3 měsíce bez změn buněčné činnosti a možnost skladování v kapalném dusíku řadu let (Chanput, Mes and Wichers, 2014). Nevýhodou THP-1 je, že se od zdravých monocytů liší v expresi některých proteinů, často některé receptory chybí nebo je jejich exprese snížena na rozdíl od periferních monocytů. Taktéž se diferencované THP-1 makrofágy liší od primárních makrofágů v míře exprese některých proteinů (Forrester *et al.*, 2018). V této práci jsem THP-1 linii využila, protože je známo, že signální dráhu TLR-4 mají neporušenou. Po stimulaci exprimují THP-1 geny MD-2, CD14 a MyD88, které jsou nutné k zahájení signální kaskády a následnou aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. Po expozici LPS jsou pak buňky schopny produkovat prozánětlivé mediátory IL-6, IL-8 a TNF α (Sharif *et al.*, 2007; Chanput, Mes and Wichers, 2014).

6.3 Využití CRISPR-Cas systému

Použitelnost technologie CRISPR-Cas9 v kmenových buňkách, indukovaných pluripotentních buňkách a somatických tkáních lidí předpovídá její revoluční potenciál v medicíně. Editace genomu zprostředkovaná CRISPR-Cas9 byla testována při léčbě rakoviny, HIV a dalších (Zhang *et al.*, 2016). CRISPR-Cas9 systém se využívá i v průmyslu. Studie Patel *et al.*, 2019 poukazuje na tzv. řasový průmysl, kde se zaměřují na výrobu paliv, potravin a nutraceutik z řas (Patel *et al.*, 2019).

7 Cíle práce

Hlavní hypotéza diplomové práce je, že sinicové LPS z vodních květů mohou vyvolat zánět a tak představovat riziko pro lidské zdraví.

Tato diplomová práce má dva hlavní cíle. Prvním cílem práce je zjistit, zda mají LPS izolované z environmentálních směsí sinicových vodních květů prozánětlivý účinek. Bude sledována produkce prozánětlivých cytokinů střevního epitelu a aktivace imunitních buněk. Druhým cílem práce je příprava TLR-4^{-/-} a TLR-2^{-/-} klonů THP-1 buněk a jejich využití při studiu mechanismu působení LPS sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905.

8 Materiál a metody

8.1 Roztoky a média

V této části jsou uvedeny použité roztoky a média, a jejich složení.

Tab. 1 DMEM médium

DMEM médium (500 ml, 31053-028, Gibco)	
FBS LE	50 ml
glutamin	5 ml
pyruvát (100 mM)	5 ml
NEAA	5 ml
Penicilin, streptomycin (10000 U, 10000 µg/ml)	5 ml

Tab. 2 RPMI médium

RPMI médium	
RPMI (práškové médium, 2560216, Pan Biotech)	10,39 g
NaHCO ₃	0,94 g
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l, pH 7,3

Tab. 3 SDS lyzační pufr

SDS lyzační pufr	
TRIS	3,025 g
SDS	5 g
EDTA (0,5 M)	1 ml
NaCl	2,92 g
glycerol	50 ml
deionizovaná H ₂ O	450 ml

Tab. 4 PBS+EDTA

PBS+EDTA	
EDTA	0,4 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,3 g
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l, pH 7,5

Tab. 5 PBS

PBS	
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,3 g
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l, pH 7,5

Tab. 6 Promývací pufr

Promývací pufr (ELISA)	
PBS (10x koncentrovaný)	100 ml
Tween20	500 µl
deionizovaná H ₂ O	900 ml, pH 7,3–7,4

Tab. 7 TBS-T

TBS-T	10x koncentrovaný
TRIS	30 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Tween20	5 ml
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l, pH 7,6

Tab. 8 Leamli pufr

Leamli pufr	5x koncentrovaný
SDS	5,00 g
TRIS	1,89 g
2-merkaptoethanol	2,5 ml
glycerol	15 ml
bromfenolová modř	7,5 mg
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 50 ml, pH 6,8

Tab. 9 Elektroforetický pufr

Elektroforetický pufr	5x koncentrovaný
SDS	5,00 g
TRIS	15,25 g
glycin	72,10 g
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l, pH 8,3

Tab. 10 Transferový pufr

Transferový pufr	10x koncentrovaný
TRIS	30,3 g
glycin	144,9 g
SDS	5,0 g
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 1 l
Před použitím byl pufr naředěn v poměru 1:2:7 (pufr-methanol- deionizovaná H ₂ O)	

Tab. 11 THP-1 médium

THP-1 médium (10% FBS)	RPMI 1640 s HEPES (500 ml, 52400-025, Gibco)
FBS	50 ml
Penicilin, streptomycin (10000 U, 10000 µg/ml)	5 ml
L-glutamin (200mM)	5 ml
glukóza (2 g/l)	3,15 ml
pyruvát sodný (100mM)	5 ml

8.2 Vzorky LPS sinicových vodních květů

Vzorky biomasy sinicových vodních květů byly odebrány v různých lokalitách České republiky. Všechny vzorky LPS byly izolovány odborníky na RECETOX (Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita) pomocí metody „hot phenol extraction“ (extrakce pomocí fenolu). Získané lyofilizované vzorky LPS byly naředěny na pracovní koncentraci pomocí 0,1% BSA (bovine serum albumin) v PBS. Dominující druhy sinic a lokality odebrání biomasy jsou v tab. 12.

Tab. 12 Přehled LPS sinicových vodních květů

Zkratka	Převládající sinice	%	Lokalita	Rok sběru
A	<i>Planktothrix agardhii</i>	42,70	Dvorský rybník	2019
B	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	24,34	Štítarský horní rybník	2019
C	<i>Aphanizomenon klebahnii</i>	49,00	Hejtman	2019
D	<i>Planktolynghya limnetica</i>	21,80	Starý Kanclíř	2019
E	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	64,70	Výtopa	2019
F	<i>Microcystis aeruginosa</i>	29,40	Nový Kanclíř	2019
G	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	43,20	Ruda	2019
H	<i>Planktothrix agardhii</i>	48,60	Kamenský Šutrák	2019
J	<i>Limnothrix redekei</i>	36,50	Františkův rybník	2019
K	<i>Microcystis aeruginosa</i>	99,10	Nové Mlýny	2019
L	<i>Microcystis aeruginosa</i>	98,90	Bítov	2019
M	<i>Microcystis viridis</i>	93,20	Letovice	2019
N	<i>Planktothrix agardhii</i>	63,70	Jedovnice	2019
O	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	96,00	Mlýnský rybník	2019
P	<i>Microcystis aeruginosa</i>	79,90	Brněnská přehrada	2019
R	<i>Microcystis aeruginosa</i>	49,30	Letovice	2020
S	<i>Planktothrix agardhii</i>	23,75	Konventský rybník	2020
T	<i>Dolichospermum crassum</i>	23,21	Kachlička	2020
U	<i>Microcystis flos-aquae</i>	57,69	Trnávka	2020

8.3 Kultivace Caco-2 buněk

Veškerá práce probíhala ve sterilních podmínkách. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) na kultivačních miskách o průměru

60 mm. Složení DMEM média je sepsáno v tab. 1. Buňky byly kultivovány v inkubátoru (37°C, 5% CO₂, 95% vlhkost).

Pasážování probíhalo 3x týdně (pondělí, středa, pátek), kultivace probíhala na Petriho miskách (TPP) o průměru 10 cm. Buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem, konfluence se pohybovala mezi 70–80 %. Poté bylo odsáto médium, přidáno 5 ml PBS+EDTA a nechalo se inkubovat 4 minuty při 37 °C. Pak bylo odebráno PBS+EDTA a přidáno 500 µl trypsinu (0,01%) a znovu bylo inkubováno 4 minuty při 37 °C. Následně byl přidán 1 ml média, buňky byly propipetovány a část suspenze byla přenesena na novou misku (většinou 1/3) a doplněna do 10 ml médiem.

Zbýlé buňky z pasáže byly připraveny na výsev. Buňky byly spočítány pomocí přístroje CASY Cell Counter (Innovatis). Po spočítání byly buňky naředěny na koncentraci 2×10^4 buněk/ml a následně byly vysety na inzerty (PET membrána s 0,4 µm póry, BD Falcon) ve 24 jamkové desce v objemu 300 µl/inzert. Do spodní části kultivační jamky bylo přidáno 800 µl média. Buňky byly kultivovány 3 týdny. Výměna média u inzertů probíhala též 3x týdně, kdy bylo měněno médium jak v inzertech (300 µl/inzert), tak v jamkách pod inzerty (800 µl/jamku). Při výměně média v inzertu se muselo postupovat velmi opatrně, aby se nepoškodilo jeho dno, tedy aby nedošlo k narušení konfluentní vrstvy buněk.

8.4 Izolace PBMC

Zdravému dárci bylo odebráno 30 ml krve do EDTA (10 µl 0,5 M EDTA/1 ml krve). Krev byla rozaliquotována do 5 zkumavek po 6 ml a pak stočena na centrifuze (ROTINA 420R, Hettich) na 25 min, 400 g, 20 °C, $a=1$, $b=0$. Dále bylo připraveno do 3 zkumavek 8 ml PBS+EDTA. Po centrifugaci bylo odebráno cca 2 ml plazmy, pak následoval odběr buffy coatu, což je tenká bílá vrstva nad erytrocyty, ve které se nacházejí leukocyty. Do 1 zkumavky s PBS+EDTA byly smíchány 2 buffy coaty a zkumavky se nechaly centrifugovat (10 min, 150 g, $a=1$, $b=0$, 20 °C). Ze zkumavek byl odebrán supernatant, bylo přidáno 8 ml PBS+EDTA a ze zkumavek s krví byl znovu odebrán usazený buffy coat a přidán k promytým buňkám. Zkumavky byly znovu nechány centrifugovat jako

v předchozím kroku. Mezitím byly připraveny 4 kónické zkumavky s 2 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich).

Po centrifugaci byl odebrán supernatant, pelety byly spojeny dohromady a výsledná suspenze byla doplněna PBS+EDTA na 8 ml. Tato suspenze (2 ml) byla opatrně navrstvena na Histopaque 1077 a zkumavky byly nechány centrifugovat (30 min, 400 g, a=1, b=0, 18 °C). Následovalo odebrání prstence PBMC, tato suspenze byla též spojena dohromady do jedné zkumavky, ke které bylo přidáno 5 ml PBS+EDTA. Naposledy byly buňky dány centrifugovat (10 min, 500 g, a+b=max, 20 °C), poté byl odlit supernatant a pelet resuspendován v 1 ml PBS. Buňky byly naředěny PBS v poměru 1:20 a spočítány na CASY Cell Counter. Po spočítání byly buňky naředěny médiem RPMI + 20% FBS LE na 2×10^6 buněk/ml a vysazeny na 24 jamkovou desku v objemu 500 µl/jamku. PBMC byly 2 hodiny nechány adherovat na povrch jamky, po tuto dobu byla deska umístěna v inkubátoru (37 °C). Poté byly buňky promyty PBS a bylo k nim přidáno 800 µl RPMI média + 20% FBS LE.

8.5 Poskládání kokulturního modelu

Model byl poskládán z již popsané buněčné linie Caco-2 a PBMC. Samotné složení spočívalo v tom, že do jamek s PBMC byl opatrně vložen inzert s diferencovanými Caco-2 buňkami. Apikálně se na inzert přidal konkrétní vzorek sinicových LPS v koncentraci 100 µg/ml. Takto složená kokultura s přidaným LPS se nechala kultivovat 4 dny v inkubátoru při 37 °C. Během této doby nebylo měněno médium. V rámci experimentu bylo celkem pět kontrolních vzorků: pozitivní a negativní kontrola kompletní kokultury, pozitivní a negativní kontrola Caco-2 buněk a negativní kontrola PBMC. Negativní „kontrola“ obsahovala PBMC a inzert bez přidaného LPS. Pozitivní kontrola „EC“ obsahovala PBMC a inzert s přidaným LPS *E. coli* O26:B6 #L8274 (100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Negativní „kontrola caco“ obsahovala inzert bez přidaného LPS a bez PBMC. Pozitivní kontrola „EC caco“ obsahovala přidaný LPS *E. coli* (100 µg/ml), jamka však neobsahovala PBMC. Negativní „kontrola PBMC“ obsahovala pouze PBMC bez inzertu a bez přidaného LPS. Ukončení experimentu zahrnovalo

odebrání média z inzertu i z jamky desky. Obě média byla stočena na centrifuze a následně zamrzena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. PBMC byly zpracovány a připraveny na průtokovou cytometrii. Caco-2 byly promyty v PBS, zamrzeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a připraveny na Western blot.

8.6 ELISA

Tzv. „sendvičová“ ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je metoda, která byla použita pro detekci cytokinů z kultivačního média. Konkrétně byly detekovány tyto cytokiny: IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, TNF α (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) a CCL20 (DuoSet ELISA, R&D Systems). Metoda byla provedena podle návodu, který byl součástí kitu. Jedinou odlišností od původního návodu bylo to, že se pracovalo s polovičními objemy, až na CCL20, kde se pracovalo s plným objemem.

Nejprve bylo na 96 jamkovou desku (Maxisorp plates, Fisher Scientific) napipetováno 50 μl primární protilátky (250x vyředěna v příslušném pufru), která pak byla ponechána přes noc v lednici ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následující den ráno byl připraven promývací roztok (složení viz tab. 6). Promývačka (Tecan) byla 3x promyta destilovanou vodou a 3x promývacím pufrem a tím připravena k použití.

V dalším kroku byla deska promyta na promývačce 3x 300 μl promývacího pufru. Následovalo blokování diluentem. Tento 5x koncentrovaný diluent byl naředěn destilovanou vodou a byl napipetován na desku v objemu 100 μl /jamku. Deska byla zabalena do fólie a nechala se inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě (RT – room temperature).

Během inkubace byl přichystán standard, který byl součástí kitu. Po inkubaci byla deska promyta v promývačce 3x300 μl promývacího pufru. Následovalo pipetování kalibrační řady (standard ve dvojkovém ředění) a vzorků. Do prvních dvou sloupečků byla napipetována kalibrační řada. Do jamek B až H bylo napipetováno 50 μl diluentu a do jamek A (A1 a A2) 50 μl standardu. Následně bylo do pipety nabráno 50 μl standardu a ten byl smíchán s obsahem jamky B. Z jamky B bylo odebráno 50 μl a tento objem byl smíchán s obsahem jamky C. Takto byl standard přepipetován až do jamky

G, po které bylo 50 µl obsahu ve špičce vyhozeno. V jamce H zůstal čistý diluent, v této jamce byla koncentrace sledovaného cytokinu nulová. Poté byly napipetovány vzorky, opět 50 µl/jamku. V případě příliš vysoké koncentrace cytokinu byl vzorek předem naředěn diluentem. Po napipetování byla deska opět zabalena do fólie a nechala se při RT inkubovat 2 hodiny.

Po uplynutí inkubační doby se nechala deska opět promýt na promývačce. Během promývání byla přichystána sekundární (detekční) protilátka konjugovaná s biotinem, 250x koncentrovaný zásobní roztok byl naředěn diluentem. Po promytí bylo do jamek napipetováno 50 µl sekundární protilátky a opět se deska nechala inkubovat 1 hodinu při RT. Pak byla deska znovu promyta na promývačce a mezitím byl připraven avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou, 250x koncentrovaný zásobní roztok byl naředěn diluentem. U některých kitů byl místo avidinu streptavidin, který byl 100x koncentrovaný. Do jamek bylo napipetováno 50 µl avidinu/streptavidinu a deska se nechala 30 minut inkubovat. Deska byla opět promyta na promývačce a do každé jamky bylo napipetováno 100 µl substrátu (TMB).

Po přidání substrátu byla změřena absorbance barevného produktu na přístroj Sunrise (Tecan), v programu Xfluo4, kde byla předem navolena vlnová délka 650 nm (modré zbarvení produktu). Měření bylo prováděno do té doby, než došla hodnota nejvyššího bodu kalibrační řady do rozmezí 0,45–0,50. V tu chvíli byla reakce zastavena přidáním 2N H₂SO₄. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl. Po přidání kyseliny došlo k zastavení reakce a změně barvy produktu na žlutou. Po přenastavení přístroje (vlnová délka 450 nm a reference 570 nm) byla naposledy změřena absorbance. Výsledná data byla uložena a vyhodnocena. Nejprve byla v Excelu vyhodnocena kalibrační křivka, podle které byla stanovena koncentrace cytokinu ve vzorcích. Poté byla data statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism (verze 8.0.1.244, GraphPad Software, USA).

Nutno podotknout, že kit CCL20 je od jiného výrobce než ostatní a liší se v návodu. V tomto kitu jsou rozdílné koncentrace a jiné inkubační doby, jinak je princip práce stejný.

8.7 Western blot

8.7.1 Příprava vzorků

Desky s inzerty byly rozmrazeny a byl připraven lyzační roztok, který obsahoval SDS lyzační pufr + 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich). Složení SDS lyzačního pufru je uvedeno v tab. 3. Do inzertů bylo napipetováno 100 μ l lyzačního roztoku, buňky byly seškrábány špičkou a vzniklé lyzáty byly přeneseny do připravených zkumavek. Zkumavky byly dány na desku s ledem. Následovala sonikace vzorků pomocí sonikátoru (Sonopuls, Bandellin). Sonikace vzorků probíhala po dobu 10 vteřin. Poté byly vzorky na 10 minut povařeny na 100 °C, čímž byly denaturovány proteiny. Následně proběhlo stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA (bicinchoninic acid) assay (Pierce™ BCA ProteinAssay kit, ThermoFisher Scientific). Do prvních dvou sloupečků na 96 jamkové desce byla napipetována kalibrační řada (roztok BSA v lyzačním pufru) v koncentraci 0–2 mg/ml. Do ostatních jamek byly napipetovány vzorky v objemu 5 μ l. Dále byl připraven pracovní reagent (WR) smícháním reagentu A a reagentu B v poměru 1:50. Poté bylo ke vzorkům napipetováno 200 μ l WR a deska se nechala inkubovat 30 minut při 37 °C. Po uplynutí této doby se deska nechala stát 10 minut při RT. Následovalo měření na spektrofotometru Sunrise při vlnové délce 562 nm. V Excelu byla vyhodnocena kalibrační křivka, podle které byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích. Vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci a poté byl ke vzorkům přidán Leamli pufr (10 μ l/50 μ l vzorku). Složení Leamli pufru viz tab. 8. Vzorky se nechaly 10 minut povařit při 100 °C a poté byly zamrazeny na –20 °C.

8.7.2 Příprava gelů

V prvním kroku byla namíchána směs na gely (viz tab. 13 a tab. 14) a sestavena aparatura.

Tab. 13 Rozdělovací gel

Rozdělovací gel	4 gely/7,5%	4 gely/12,5%	4 gely/15%
H ₂ O	15 ml	10 ml	7 ml
1,5M TRIS, pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Akrylamid-bis 30%	7 ml	12 ml	15 ml
SDS 10%	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml
TEMED	45 µl	45 µl	45 µl
APS	250 µl	250 µl	250 µl

Tab. 14 Hřebínkový gel

Hřebínkový gel	2 gely	4 gely
H ₂ O	5 ml	13 ml
0,5M TRIS, pH 6,8	2,1 ml	5,6 ml
Akrylamid-bis 30%	1,5 ml	4 ml
SDS 10%	0,7 ml	1,8 ml
TEMED	45 µl	45 µl
APS	100 µl	250 µl

Po namíchání byla směs rozdělovacího gelu nalita do aparatury a byl přidán isopropanol, který zamezil osychání gelu a zajistil rovnou hladinu gelu bez bublin. Po ztuhnutí gelu byl isopropanol odstraněn. Dále byla přilita směs na hřebínkový gel, do které byl hned vložen 15 jamkový hřebínek, a směs byla nechána tuhnout. Takto připravené gely byly ponechány přes noc v lednici v nádobce s elektroforetickým pufrem. Byly připraveny tři druhy gelů: 7,5%, 12,5% a 15%. 7,5% gel byl použit pro detekci ZO-1, 12,5% gel pro detekci claudinu 4 a occludinu a 15% pro detekci claudinu 2.

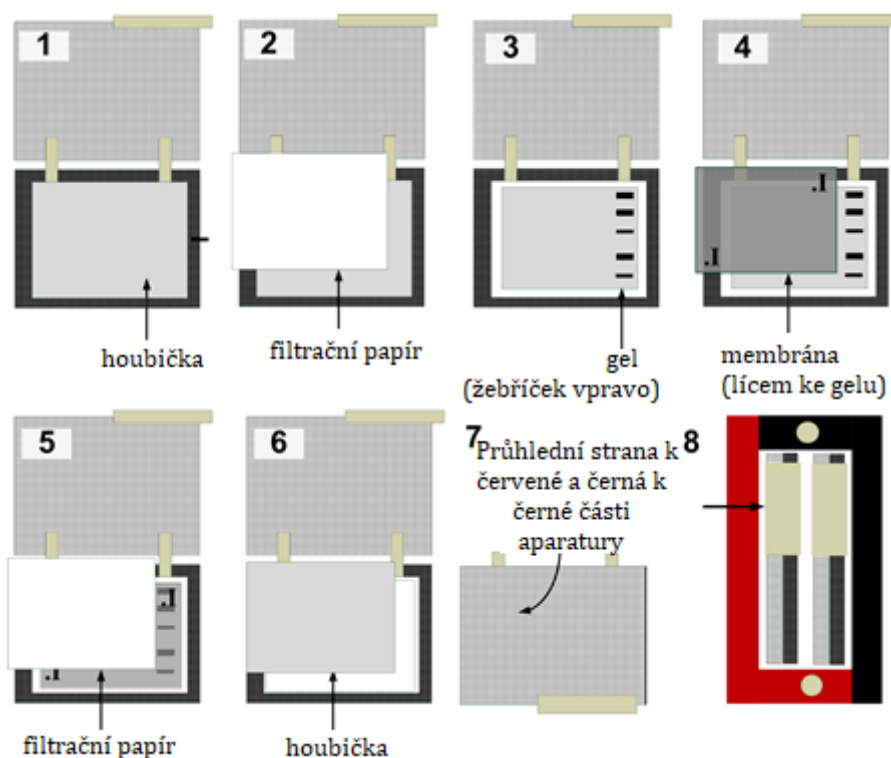
8.7.3 Elektroforéza

Z připravených gelů byly opatrně vyjmuty hřebínky, aby se neponičily jamky. Gely byly opatrně promyty destilovanou vodou, vloženy do aparatury na elektroforézu a zality elektroforetickým pufrem (složení pufru viz tab. 9). Vzorky byly rozmrazeny, nechaly se krátce povařit (100 °C, 10 minut) a krátce se stočily na centrifuze. Do krajních jamek byly napipetovány 2 µl/jamku žebříčku (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder,

ThermoFisher Scientific). Následně byly napipetovány vzorky do ostatních jamek (10 μ l/jamku). Byla spuštěna elektroforéza nejprve na 15 minut na 70 V a poté na přibližně 60 minut na 130 V. Elektroforéza byla ukončena, když tzv. čelo vyjelo na spodu gelu a poté následovalo tzv. blotování (přenos proteinů).

8.7.4 Přenos proteinů (blotting) a analýza

Ve vaničce s transferovým pufrém (složení viz tab. 10) byla připravena černobílá blotovací aparatura, tzv. „sendvič“ (obr. 7). Na obě strany sendviče byly dány houbičky, na houbičky filtrační papír. PVDF (polyvinylidene difluoride) membrána byla aktivována v methanolu.



Obr. 7 Western blot

Do připraveného sendviče byla vložena membrána, na ní byl opatrně dán gel a sendvič byl uzavřen. Následně byl sendvič vložen do nádoby s ledovým bločkem. Nádoba se sendvičem byla poté naplněna transferovým pufrém (složení pufru viz

tab. 10) a obsypána ledem v polystyrenovém boxu. Poté bylo spuštěno blotování na 2,5 hodiny při 300 mA.

Po ukončení blotování byly membrány vloženy na 1 hodinu do blokovacího roztoku. Jako blokovací roztok bylo použito 5 ml 5% odtučněného mléka nebo 5% BSA. Mléko i BSA bylo rozpuštěno v TBS-T (tris-buffered saline-Tween, složení je popsáno v tab. 7). Odtučněné mléko bylo používáno u proteinů ZO-1 a β -actin, BSA u proteinů claudin 2, claudin 4 a vinculin. Poté byly membrány inkubovány v primární protilátce za stálého míchání (na roleru) při 4 °C přes noc. Byly použity protilátky proti ZO-1 (myší monoklonální protilátka, ThermoFisher Scientific, 33-9100), claudinu 2 (myší monoklonální protilátka, Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-293233), claudinu 4 (myší monoklonální protilátka, Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-376643), β -actinu (myší monoklonální protilátka, Sigma-Aldrich, A5441) a vinculinu (králíčí monoklonální protilátka, Cell signaling technology, #13901). Všechny primární protilátky byly ředěné v poměru 1:1000 kromě protilátky proti β -actinu, která byla ředěná 1:5000.

Další den byly membrány promyty v TBS-T 3x15 minut. Po promytí byly k membránám přidány sekundární protilátky, všechny byly ředěné v poměru 1:2000. K detekci vinculinu byla použita protilátka proti králíčímu IgG (Cell signaling technology, #7074) a k detekci claudinu 2, claudinu 4, ZO-1 a β -actinu protilátka proti myšímu IgG (Cell signaling technology, #7076). Inkubace probíhala při stálém míchání 1 hodinu při RT. Pak byly membrány znovu promyty TBS-T 3x15 minut. Pomocí chemiluminiscenčního substrátu (ThermoFisher Scientific) byla provedena detekce proteinů. Chemiluminiscence byla následně zachycena pomocí Amersham Imager 680 (Cytiva). Získané snímky byly vyhodnoceny pomocí denzitometrie v programu ImageJ (ImageJ bundled with 64-bit Java 8, NIH, USA).

8.8 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita pro detekci exprese povrchových markerů CD14 a CD16 u PBMC a viability buněk. Byly měřeny 2 typy buněk: čerstvě izolované a buňky po kultivaci.

8.8.1 Izolované buňky

Buňky byly resuspendovány v PBS (složení viz tab. 5) a spočítány na CASY Cell Counter. Dále byly buňky naředěny na koncentraci 2×10^6 buněk/ml v blokačním roztoku (PBS + 10% lidské sérum). Poté bylo do flowcytometrických zkumavek napipetováno 150 μ l buněk, přidána protilátka (popsáno níže) a následovalo měření na průtokovém cytometru BD FACSVersTM (BD Biosciences).

8.8.2 Buňky po kultivaci

Z 24 jamkových desek bylo médium odsáto do flowcytometrických zkumavek. Zkumavky byly stočeny na centrifuze při 200 g, 7 minut a RT. Médium bylo následně přelito do eppendorfových zkumavek a zamrazeno (-20 °C). Do jamek na desce bylo napipetováno 500 μ l 10mM EDTA v PBS a deska se nechala inkubovat 10 minut při 37 °C. Poté byl obsah jamek propipetován a přenesen do odpovídajících flowcytometrických zkumavek z předchozího kroku. Do jamek bylo následně přidáno 500 μ l PBS a měkkou škrabkou byly seškrábány zbývající buňky, které byly přeneseny do flowcytometrických zkumavek. Zkumavky byly doplněny PBS na 4 ml a nechaly se centrifugovat na 250 g, 7 minut při RT. Dále byl odlit supernatant a buňky byly resuspendovány ve 150 μ l blokačního roztoku a blokovány při 4 °C 15 minut. Mezitím byly přichystány protilátky proti CD14 (APC anti-human CD14, SONY Biotechnology) a CD16 (FITC anti-human CD16, SONY Biotechnology). Protilátky byly smíchány a po blokování aplikovány naráz v objemu 6 μ l (3+3 μ l) do každého vzorku. Následovala inkubace při 4 °C 20 minut. Poté byly přidány 4 ml studeného PBS a zkumavky byly stočeny na centrifuze (250 g, 7 min, 4 °C). Po centrifugaci byl odlit supernatant, buňky byly resuspendovány ve 150 μ l studeného PBS a následovalo měření na průtokovém cytometru BD FACSVersTM. Těsně před měřením bylo do vzorku napipetováno 2 μ l PI (propidium iodide, 1 mg/ml). Získaná data byla zpracována a vyhodnocena v programu FlowJoTM v10.8 (BD Life Sciences).

8.9 Selekce klonů

Od kolegyně byly převzaty THP-1 transfekované plazmidem ne nesoucím Cas9 nukleázu a gRNA (viz tab. 15) pro TLR-4 a TLR-2 nebo scrambled (= prázdný plazmid). Buňky byly po elektroporaci pomocí buněčného sorteru (BD FACS Aria™ II Cell Sorter, BD Biosciences) vysety po jedné buňce na 96 jamkovou desku na základě pozitivitu na signál GFP (green fluorescence protein). Díky tomu bylo možné z každé jamky získat kolonii potenciálního klonu vzniklou z jediné mateřské buňky. Pro selekci úspěšných KO klonů byla testována jejich odpovídavost na modelový ligand. Neodpovídavé klony byly poslány na sekvenaci pro potvrzení KO mutace na všech alelách.

Desky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkosti. Práce s klony probíhala v laminárním boxu. Dva týdny po sortingu byly klony denně kontrolovány. Pokud se v jamce objevila kolonie buněk, byl obsah jamky přenesen na 24 jamkovou desku a doplněn na 1 ml THP-1 médiem (složení viz tab. 11). Médium bylo nahřáté na 37 °C a těsně před použitím k němu byl přidán 2-merkapt ethanol (0,5 µl/1 ml média, finální koncentrace 0,05 mM). Koncentrace buněk byla průběžně sledována pomocí CASY Cell Counter. Po dosažení koncentrace 5x10⁵ – 8x10⁵ buněk/ml, byly buňky přeneseny na 6 jamkovou desku a naředěny na koncentraci 1,5x10⁵ – 2x10⁵ buněk/ml. Po dosažení koncentrace 8x10⁵ – 1x10⁶ buněk/ml byly buňky testovány, zdali došlo k neodpovídavosti na modelový stimul.

Tab. 15 Sekvence gRNA

gRNA TLR-4 AB	TGGTTTAGAAGTCCATCGTT
gRNA TLR-4 EF	GAAGTCCATCGTTTGGTTCT
gRNA TLR-2	ACCGCAATGGTATCTGAA

8.9.1 Testování odpovídavosti klonů TLR-4

Na 24 jamkovou desku bylo vyseto 2,5x10⁵ buněk/jamku. Od každého klonu byly vysety dvě jamky, jedna sloužila jako negativní kontrola a do druhé byl přidán modelový ligand, LPS (*E. coli* O26:B6) rozpuštěný v 0,1% BSA v PBS, finální

koncentrace v jamce byla 1 µg/ml. Po 6 hodinách byl obsah jamek stočen na centrifuze (7 min, 250 g, RT). Supernatant byl testovaný pomocí ELISA metody (popis metody viz výše) na přítomnost TNFα. Klony, u kterých byla hladina TNFα po expozici *E. coli* LPS blízka negativní kontrole, byly poslány na sekvenaci.

8.9.2 Testování odpovídavosti klonů TLR-2

Na 24 jamkovou desku bylo vyseto 2×10^5 buněk/jamku. Od každého klonu byly vysety dvě jamky. Pro aktivaci THP-1 buněk a získání M0 makrofágů s expresí TLR-2 bylo přidáno 10 µl 5 µM PMA naředěného v PBS. Finální koncentrace PMA v jamce byla 100 nM. Po 24 hodinách bylo médium s PMA vyměněno za čerstvé médium bez PMA, aby se buňky uklidnily. Po 48 hodinách bylo médium opět vyměněno. Jedna jamka sloužila jako negativní kontrola a do druhé byl přidán modelový ligand HKLM (heat-killed *Listeria monocytogenes*) (InvivoGen, #tlrl-hklm) v 0,1% BSA v PBS. Finální koncentrace HKLM v jamce byla 10^7 bakterií/ml. Po 6 hodinách byl obsah jamek stočen na centrifuze (7 min, 250 g, RT). Supernatant byl testovaný pomocí ELISA metody (popis metody viz výše) na přítomnost TNFα. Klony, u kterých byla hladina TNFα po expozici HKLM blízka negativní kontrole, byly poslány na sekvenaci. Pro analýzu efektu Ap1 (LPS sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905) na úspěšných klonech byl použit stejný postup. Finální koncentrace Ap1 byla 1 µg/ml a HKLM 10^8 bakterií/ml.

8.10 Sekvenace potenciálních klonů

8.10.1 Izolace chromozomů

Izolace probíhala podle návodu od výrobce (CatchGene Cell/Blood DNA Kit, CatchGene). Buňky byly kultivovány, jak je popsáno výše. Pro izolaci bylo stočeno do 1,5 ml mikrozkušavek 2×10^6 buněk (5 min, 100 g, RT). Pelet byl resuspendován v 200 µl THP-1 média. Poté bylo přidáno 20 µl proteinázy K, zkumavky byly vortexovány 10 sekund a zahřáty 10 minut při 60 °C. Poté byly zkumavky krátce stočeny, a přidalo se 200 µl 96% etanolu. Následně byly zkumavky pulsně vortexovány 15 sekund. Celý obsah zkumavky byl přenesen do Spin Column (kolonka) vložené do

Collection Tube (sběrací zkumavka). Následovala centrifugace 1 min, 11000 g, RT. Tekutina ve sběrací zkumavce byla vyhozena a kolonka byla dvakrát promyta 700 µl Buffer W1 a stočena 1 min, 11000 g, RT. Následně byla kolonka jednou promyta 700 µl Buffer W2 a opět centrifugována 1 min, 11000 g, RT. Pro zbavení se zbytků promývacích roztoků byla kolonka ještě jednou stočena 3 min, 11000 g, RT. Na závěr byla kolonka přesunuta do nové 1,5ml zkumavky. Pro co nejvyšší výtěžek, ale co nejkoncentrovanější vzorek bylo přidáno 30 µl Elution Buffer a kolonka se nechala stát 3 minuty, RT a poté byla stočena na 3 min, 11000 g, RT. Izolované chromozomy byly zamrazeny na -80 °C.

8.10.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Všechny reagenty byly drženy na ledu a pracovalo se ve sterilním PCR boxu. Master mix pro jeden vzorek obsahoval 1 µl dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfáty), 1 µl FWD (forward) primeru, 1 µl REV (reverse) primeru, 2,5 µl pufru, 0,5 µl LA (long and accurate) polymerázy a 15 µl DEPC (diethyl pyrokarbonát) vody. Sekvence navržených primerů jsou v tab. 16. K celkovému objemu 21 µl v mikrozkuhavce byly přidány 4 µl vzorku (izolovaných chromozomů). Následně byly zkumavky protřepány pouze poklepem (nevortexovaly se), byly vloženy do PCR cycleru (TurboCycler Lite, Blue-Ray Biotech) a byl zapnut příslušný program (viz tab. 17).

Tab. 16 Sekvence primerů

TLR-4 FWD	GGACCTTTCAGCAACAAGATTC
TLR-4 REV	TAGGCTGGTTGTCCCAAATC
TLR-2 FWD	TGTGGATGGTGTGGGTCTTG
TLR-2 REV	TTTCCCCTCTCAGGATTTGC

Tab. 17 Teplotní profil PCR

Proces	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	5 min
Denaturace	94 °C	1 min
Annealing	56 °C	30 s
Extenze	72 °C	3 min
Konečná extenze	72 °C	10 min
Chlazení	4 °C	3 h

8.10.3 Přečištění PCR produktu

Postupovalo podle návodu od výrobce (QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN). Stejně jako při izolaci chromozomů, i tato metoda probíhala v PCR boxu. Byl přichystán pH indikátor a Buffer PB v poměru 1:250. K 25 µl PCR mixu byl přidán pětinasobek, tedy 125 µl Buffer PB. V případě, že byla barva mixu mezi oranžovou a fialovou, tak bylo přidáno 10 µl 3M octanu sodného (pH 5,0), aby bylo dosaženo žluté barvy vzorků. Celý objem byl přenesen na QIAquick Column (kolonku) vloženou do sběrné zkumavky. Poté proběhla centrifugace 1 min, 18 000 g, RT. Kolonka byla promyta 700 µl Buffer PE a znovu proběhla centrifugace 1 min, 18 000 g, RT. Zbytek tekutiny byl odstraněn ze zkumavky další centrifugací 1 min, 18 000 g, RT. Kolonka byla následně přenesena do čisté 1,5ml zkumavky. K eluci DNA bylo použito 30 µl Buffer EB, inkubace 3 minuty při RT a centrifugace 1 min, 18 000 g, RT. Z přečištěného produktu byl nachystán vzorek pro sekvenaci a zbylý vzorek byl zamražen na -80 °C.

8.10.4 Zaslání vzorků na sekvenaci

V 1,5ml zkumavce bylo smícháno 5 µl přečištěného PCR produktu a 5 µl FWD primeru (stejný jako u PCR). Zkumavky byly označeny čárovým kódem (barcode) a byly poslány na sekvenování do firmy Eurofins Genomics. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny kolegyní v programu ICE CRISPR Analysis Tool (Synthego). Sekvence klonů byla porovnávána s wild-type (WT) sekvencí získanou stejným způsobem jako sekvence klonů.

8.11 Statistika

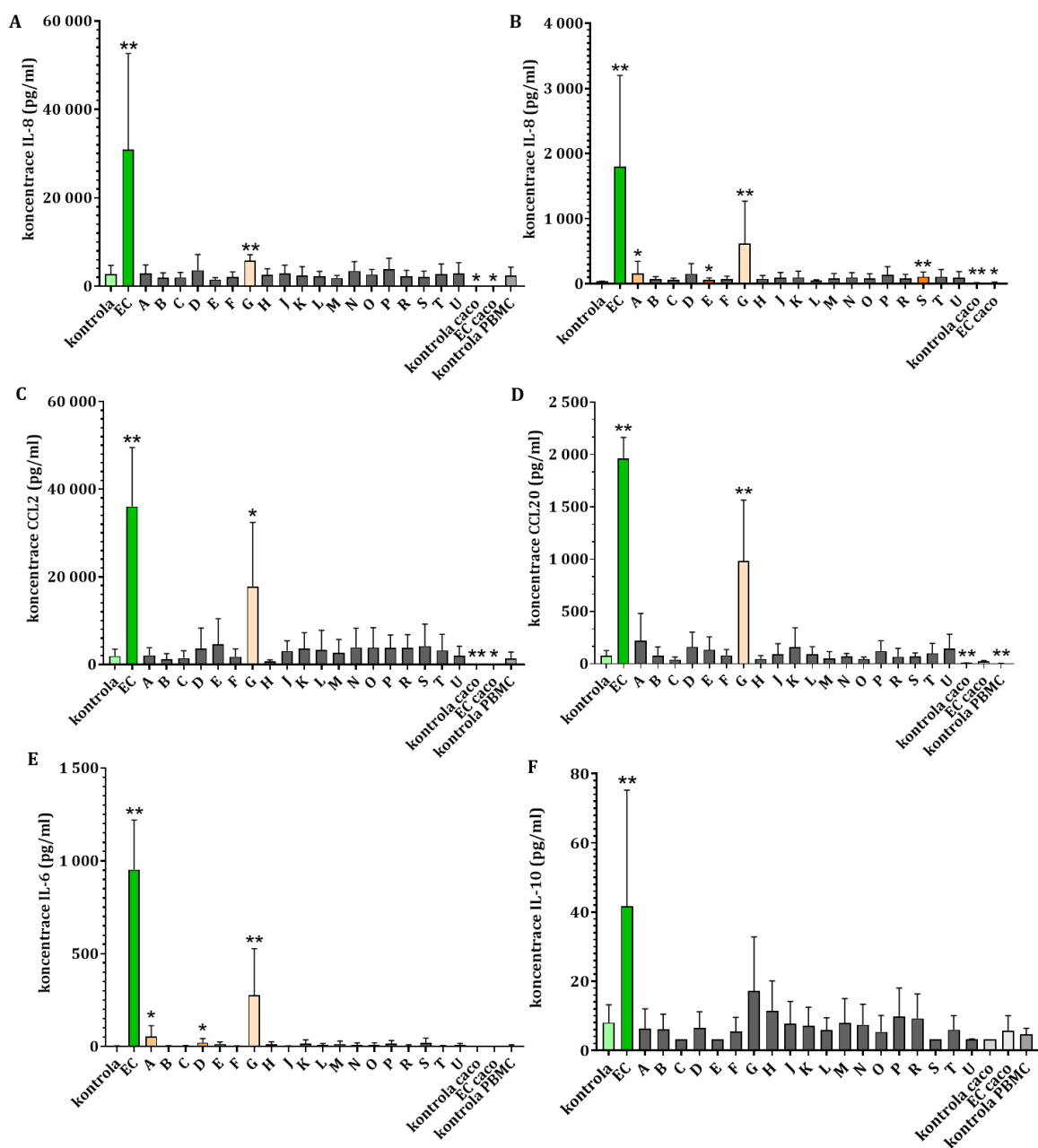
Statistické zhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism (verze 8.0.1.244, GraphPad Software, USA). V prvním kroku byl proveden test na vyloučení odlehlých hodnot. Jednovýběrový t-test byl použit u dat, která se přepočítávala na kontrolu. Nepárový t-test byl nakopak použit u dat, která se na kontrolu nepřepočítávala. V případě, že došlo k neshodnosti rozptylů (F test vyšel významně), byl místo nepárového t-testu použit neparametrický Mann-Whitneyho test. Významnost byla stanovena proti negativní kontrole. U TLR-2 KO klonů byla použita dvoucestná ANOVA, významnost byla stanovena proti kontrole s prázdným plazmidem (scrambled). Významnost byla vyjádřena jako * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

9 Výsledky

9.1 Produkce cytokinů

Ze vzorků z kokultury byla odebrána média a stanovena produkce cytokinů pomocí metody ELISA. Konkrétně byly stanoveny cytokiny IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 a CCL20. Tyto cytokiny byly detekovány v bazolaterálním médiu kokultury, tedy v médiu s PBMC. Výjimkou byl cytokin IL-8, který byl stanovován i v apikálním médiu, kde se nacházely Caco-2 buňky. Na obr. 8 je vidět statistický rozdíl v produkci prozánětlivých cytokinů u některých vzorků. Mimo IL-10 byl u všech cytokinů zaznamenán statisticky významný nárůst produkce cytokinů u vzorku G, ve kterém byl nejdominantnější druh *Dolichospermum flos-aquae*. Nejvíce změn bylo zaznamenáno u cytokinu IL-8 měřeného v apikálním médiu s Caco-2 buňkami. Mimo pozitivní kontroly byly statisticky významné další 4 vzorky (A, E, G, S). V těchto vzorcích byly aplikované vzorky LPS vodních květů, ve kterých převažovaly sinice druhu *Planktothrix agardhii* a *Dolichospermum flos-aquae*. U IL-6 vyšel statisticky významně ještě vzorek D, ve kterém dominoval druh *Aphanizomenon klebahnii*. U CCL2, CCL20 a IL-8 z bazolaterálního média nebyla viditelná významná změna v produkci cytokinů mimo již zmíněného vzorku G.

Koncentrace cytokinů v kontrolních vzorcích bez PBMC (kontrola caco a EC caco) byla často významně nižší než u kontroly kokultury. Imunitní buňky tedy pravděpodobně zvyšují citlivost Caco-2 buněk. Naopak kontrola bez inzertu (kontrola PBMC) se s výjimkou CCL20 významně nelišila od kontroly kokultury. Samotná přítomnost inzertu tedy nevedla k aktivaci PBMC.



Obr. 8 Produkce cytokinů

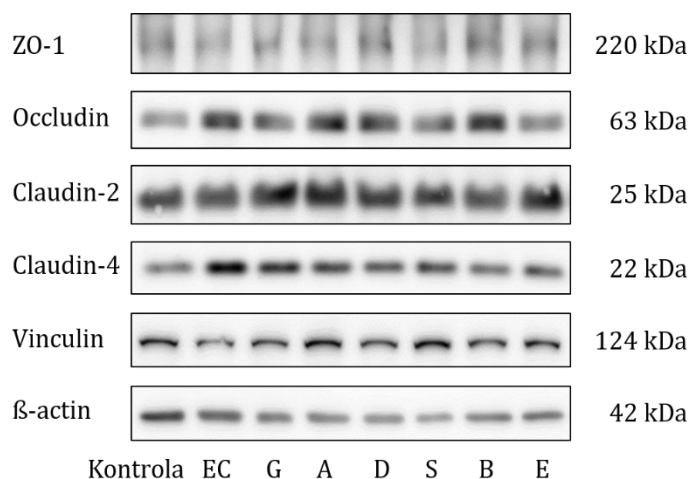
Stanovení produkce cytokinů v kokultuře po aplikaci zvolených LPS vodních květů v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Jako pozitivní kontrola „EC“ byl použit LPS *E. coli* v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Do negativní „kontroly“ nebyl přidán LPS. Negativní „kontrola caco“ neobsahovala PBMC a pozitivní kontrola „EC caco“ neobsahovala PBMC, ale na inzert byl přidán LPS *E. coli*. Negativní „kontrola PBMC“ obsahovala PBMC bez přidání inzertu. Stanovení proběhlo po 4 dnech kultivace pomocí metody ELISA.

A: IL-8 (bazolaterální médium); **B:** IL-8 (apikální médium); **C:** CCL2 (bazolaterální); **D:** CCL20 (bazolaterální); **E:** IL-6 (bazolaterální); **F:** IL-10 (bazolaterální). Data jsou zobrazena jako průměr $\pm$ SD. Významnost je určena pomocí nepárového t-testu vůči kontrole * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 8$.

9.2 Exprese proteinů těsných spojů

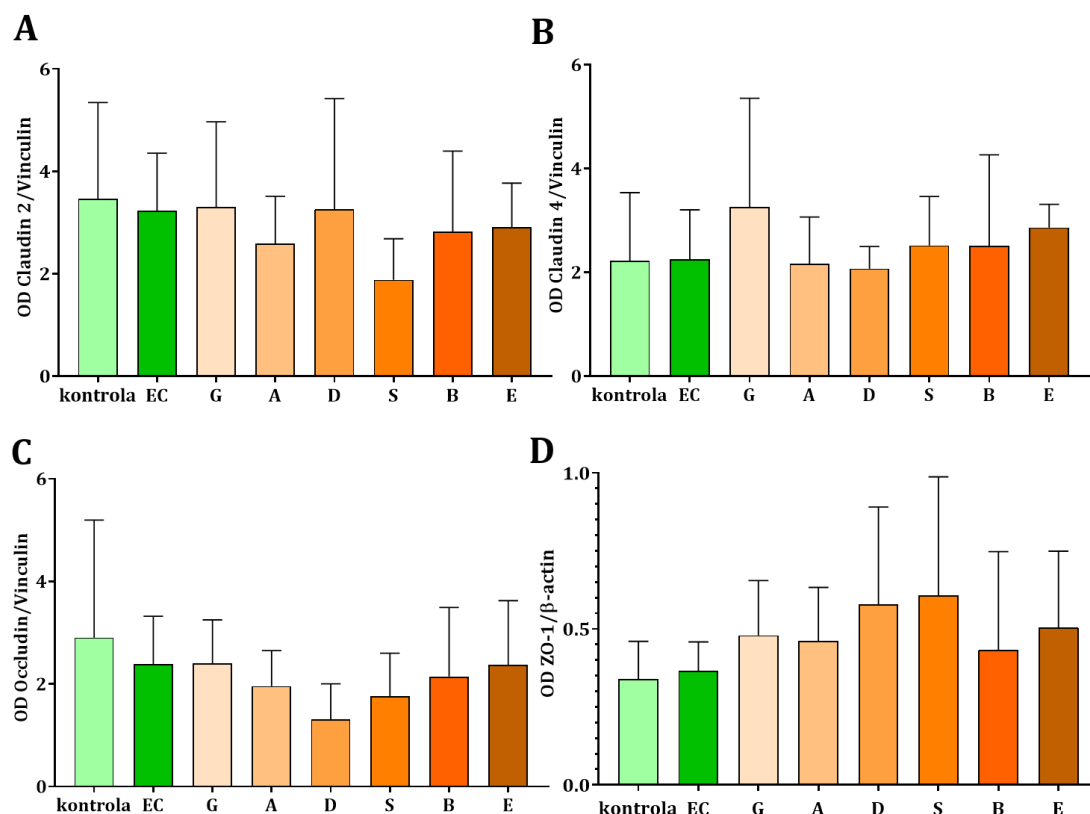
Pomocí metody western blot byla sledována exprese proteinů těsných spojů a její případné změny po aplikaci vybraných LPS vodních květů na kokulturu. Mezi sledované proteiny patřily claudin 2, claudin 4, occludin a ZO-1.

V produkci proteinů těsných spojů v monovrstvě Caco-2 buněk nebyla zaznamenána statisticky významná změna ani u jednoho ze sledovaných proteinů. Významná změna nebyla vidět ani u pozitivní kontroly, viz obr. 9 a 10. Vzhledem k tomu, že k žádné významné změně exprese proteinů těsných spojů nedošlo u vzorků, které vykazovaly aktivitu v předchozích experimentech, od western blotů neaktivních LPS jsme upustili.



Obr. 9 Western blot analýza

Reprezentativní snímky z western blotu. Jako referenční proteiny byly použity vinculin a β-actin.



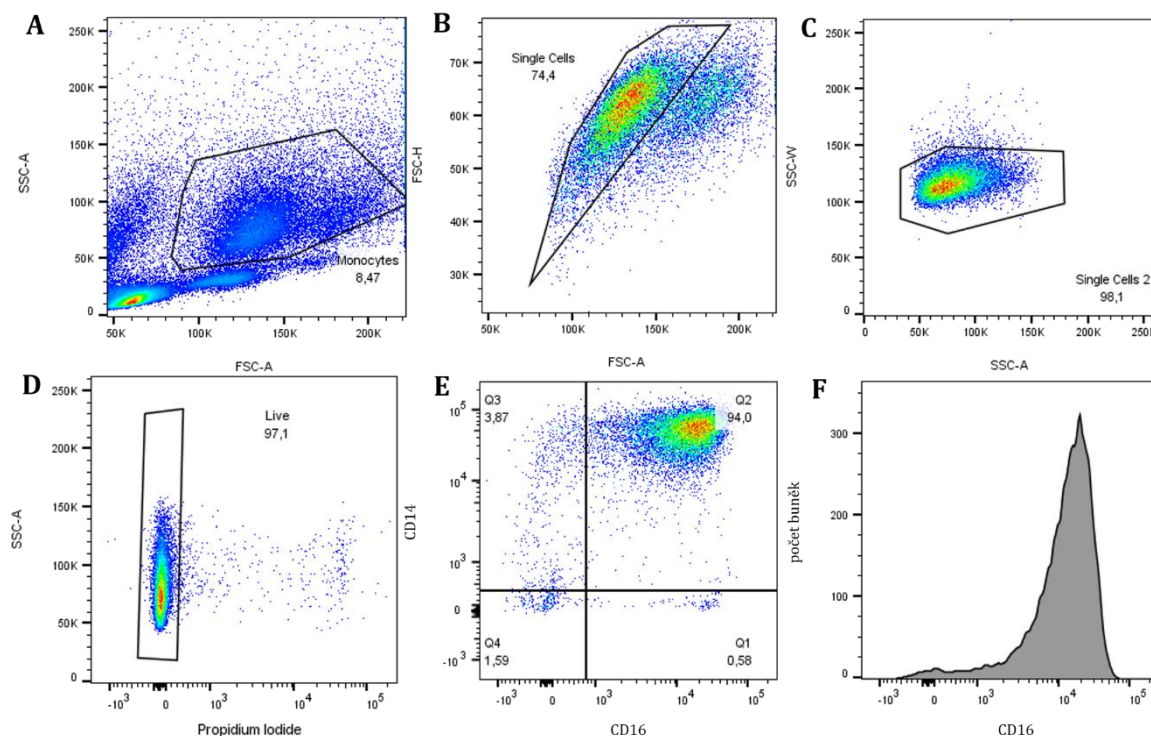
Obr. 10 Stanovení exprese proteinů těsných spojů

Stanovení exprese proteinů těsných spojů v monovrstvě Caco-2 buněk po aplikaci zvolených LPS vodních květů v koncentraci 100 µg/ml. Jako pozitivní kontrola „EC“ byl použit LPS *E. coli* v koncentraci 100 µg/ml. Do negativní „kontroly“ nebyl přidán LPS. Proteiny byly stanovené po 4 dnech metodou Western blot. Kvantifikace proteinů těsných spojů byla stanovena pomocí denzitometrie. Hodnoty jsou vyjádřeny v poměru: proteiny těsných spojů/referenční protein. Data jsou zobrazena jako průměr ± SD. Významnost byla určena pomocí nepárového t-testu vůči kontrole. **A:** Claudin 2/Vinculin; **B:** Claudin 4/Vinculin; **C:** Occludin/Vinculin; **D:** ZO-1/β-actin. n = 4–8. OD – optická denzita

9.3 Aktivace monocytů

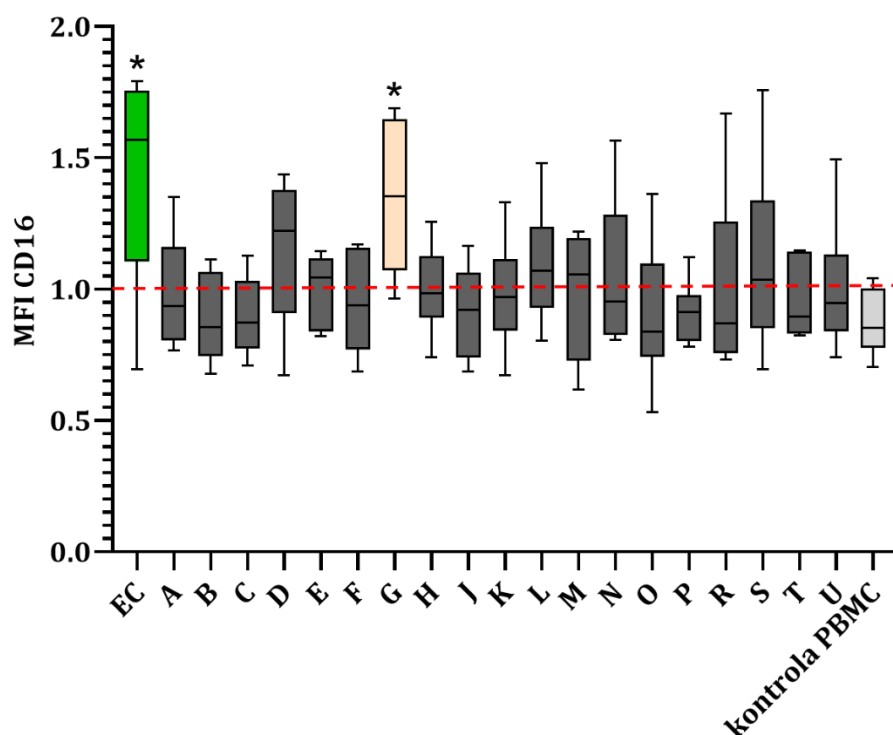
Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena aktivace monocytů v PBMC po nepřímé stimulaci LPS na základě exprese markeru CD16 na povrchu buněk. Měření proběhlo po 4 dnech kultivace kokultury s vybranými vzorky LPS. Data byla zpracována v programu FlowJo, gatovací strategie je uvedena na obr. 11. MFI (median fluorescence index) byl počítán ze tří kvartilů, ve kterých byly buňky pozitivní na CD14 a/nebo

CD16. Do výpočtu se nezahrnoval čtvrtý kvartil, který obsahoval buňky negativní na CD14 a CD16. Statisticky významně zvýšená exprese CD16 byla pozorována u pozitivní kontroly „EC“ obsahující LPS *E. coli* a vzorku G (viz obr. 12).



Obr. 11 Gatovací strategie

Pomocí gatovací strategie byly odděleny monocyty od ostatních buněk a dále vyhodnoceny. **A:** ohraničení populace monocytů, oddělení od lymfocytů a buněčného odpadu; **B:** odstranění dubletů (na základě FSC-A/FSC-H); **C:** odstranění dubletů (na základě SSC-A/SSC-W); **D:** ohraničení živých buněk (PI negativní) a oddělení od mrtvých buněk a odpadu; **E:** rozdělení do čtyř kvartilů (na základě exprese CD16/CD14); **F:** exprese CD16 v kvartilech Q1–Q3



Obr. 12 MFI CD16

Stanovení aktivace monocyty v kokultuře na základě exprese CD16 po 4 dnech stimulace vybranými LPS (100 µg/ml). Jako pozitivní kontrola „EC“ byl použit LPS *E. coli* v koncentraci 100 µg/ml. Do negativní „kontroly“ nebyl přidán LPS. Negativní „kontrola PBMC“ obsahovala pouze PBMC bez inzertu. Medián CD16 je vypočten z monocytyární populace s vyloučením buněk negativních současně na CD14 i CD16. Vzorky jsou přepočítány na kontrolu, která je vyznačena červenou přerušovanou čarou. Významnost je určena pomocí jednovýběrového t-testu vůči kontrole * $p < 0,05$. $n=6$. MFI – median fluorescence index

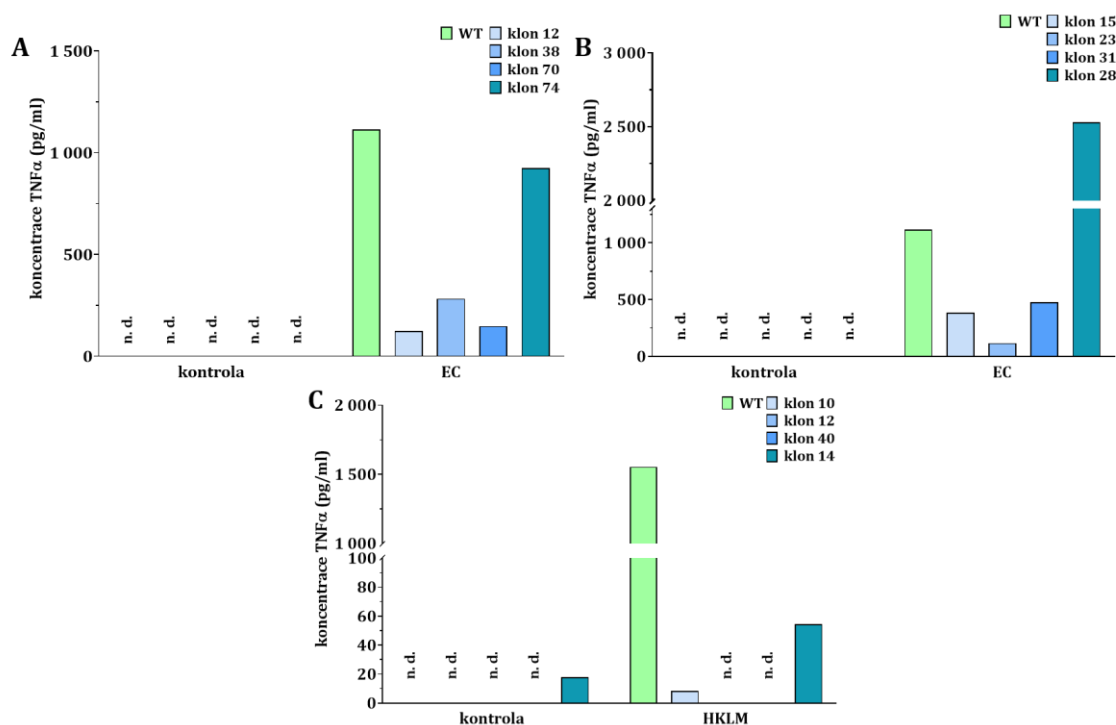
9.4 Testování odpovídavosti KO klonů TLR-2 a TLR-4 na modelový ligand

V první části práce je ukázáno, že některé LPS sinicových vodních květů mají prozánětlivý účinek. Z dat našeho týmu, která nejsou součástí této diplomové práce víme, že i LPS některých sinicových druhů mohou mít prozánětlivý efekt. Ale tyto data nejsou zatím publikována. Zároveň dosavadní výsledky naznačují, že tyto námi studované aktivní sinicové LPS nepůsobí přes TLR-4. Abychom to prokázali, připravovali jsme klony THP-1 buněk s knockoutovaným TLR-2 a TLR-4.

Po úspěšné elektroporaci, selekci a kultivaci potenciálních klonů byly klony TLR-4^{-/-} testovány na odpovídavost vůči modelovému ligandu LPS *E. coli* a klony TLR-2^{-/-} vůči modelovému ligandu HKLM. Byla provedena ELISA pro detekci produkce cytokinu TNF α , viz obr. 13.

Po transfekci pomocí plazmidu nesoucího gRNA TLR-4 AB bylo získáno 107 klonů, ze kterých byly na sekvenaci poslány tři klony vybrané na základě snížené odpovídavosti na ligand. Jednalo se o klony 12, 38 a 70 (Obr. 13 A). Sekvenací však bylo zjištěno, že tyto tři klony jsou nevyhovující (Obr. 15). Z tohoto důvodu byly připraveny klony s pomocí plazmidu nesoucího gRNA TLR-4 EF, kde bylo získáno 42 klonů. Tři klony (15, 23, 31) vykazovaly sníženou odpovídavost vůči ligandu (Obr. 13 B).

Po transfekci pomocí plazmidu nesoucího gRNA TLR-2 bylo získáno 60 klonů, ze kterých byly tři klony (konkrétně klony 10, 12 a 40) nejméně odpovídavé na modelový ligand. V kontrastu s WT a klonem 14 (který s největší pravděpodobností není TLR-2^{-/-}) můžeme vidět velké snížení produkce TNF α po aktivaci HKLM vůči negativní kontrole (Obr. 13 C). Klon 14 zároveň vykazuje spontánní produkci TNF α i bez stimulace ligandem, kdežto ostatní klony nic neprodukují. Tento klon tudíž nebude vhodný pro případné další experimenty.



Obr. 13 Produkce TNF α klony TLR-4^{-/-} a TLR-2^{-/-} po expozici modelovému ligandu.

Stanovení produkce cytokinu TNF α pomocí metody ELISA po 6 hodinové stimulaci modelovým ligandem. Modelový ligand pro TLR-4 byl LPS *E. coli* (O26:B6, 100 μ g/ml) a pro TLR-2 HKLM (10⁸ bakterií/ml). Negativní „kontrola“ neobsahovala přidaný modelový ligand. **A:** Klony TLR-4 AB. Potenciální TLR-4^{-/-} klony 12, 38, 70 a WT a neúspěšný TLR-4^{-/-} klon 74. **B:** Klony TLR-4 EF. Potenciální TLR-4^{-/-} klony 15, 23, 31 a WT a neúspěšný TLR-4^{-/-} klon 28. **C:** Klony TLR-2. Potenciální TLR-2^{-/-} klony 10, 12, 40 a WT a neúspěšný TLR-2^{-/-} klon 14. n=1, n. d. – nedetekovatelné

9.5 Sekvenování

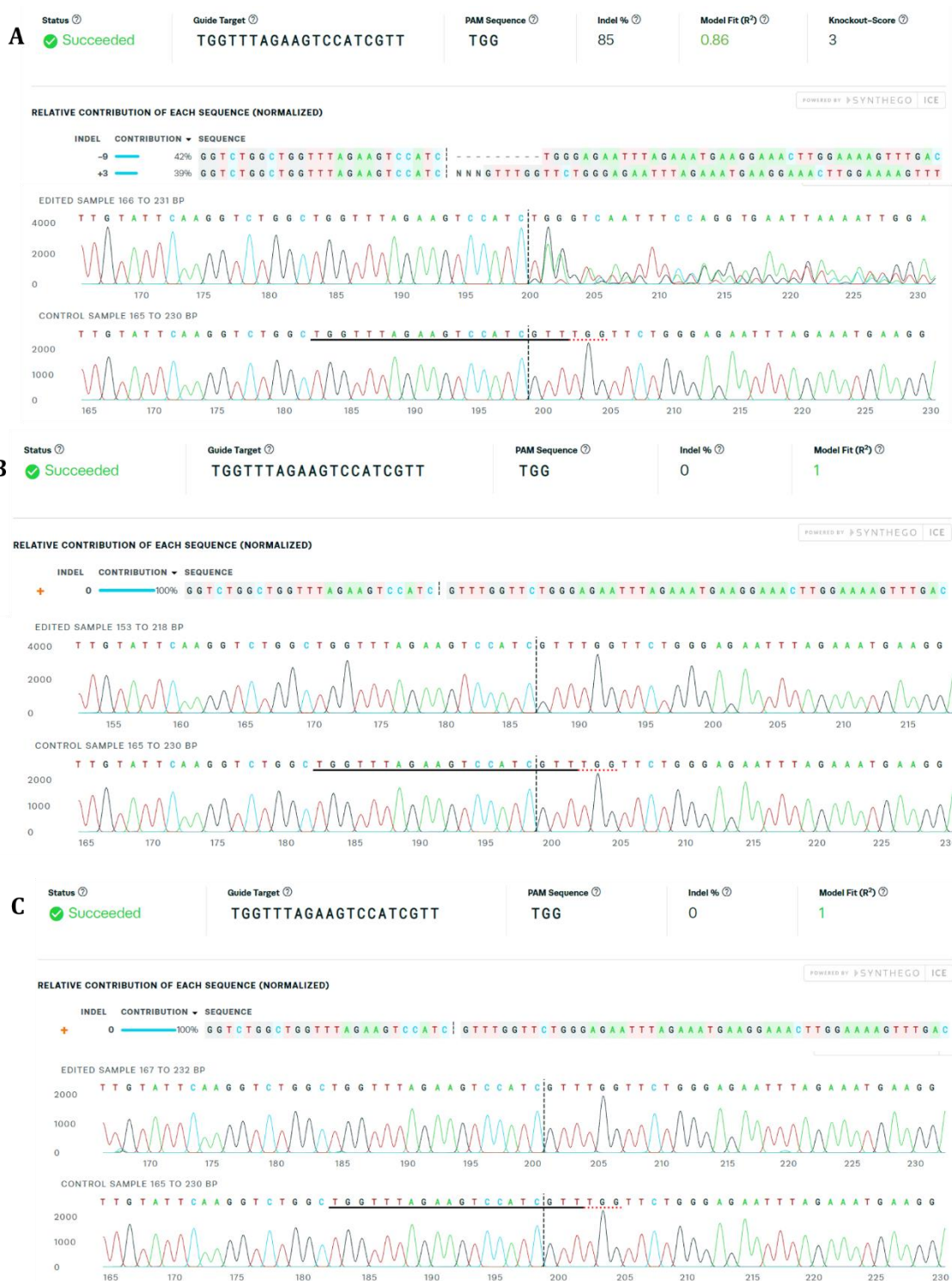
Na sekvenaci byly poslány TLR-2^{-/-} klony 10, 12 a 40. Po vyhodnocení v programu ICE CRISPR Analysis Tool můžeme vidět na obr. 14, že se opravdu jedná o TLR2^{-/-} klony. Klon 10 (Obr. 14A) obsahuje delecí jednoho nukleotidu. 66 % osekvenovaného produktu mělo delecí cytosinu a 34 % osekvenovaného vzorku mělo delecí guaninu. Klon 12 (Obr. 14B) obsahuje taktéž delecí jednoho nukleotidu. 50 % osekvenovaného vzorku mělo delecí v guaninu, 26 % vzorku mělo delecí v cytosinu. Zároveň 22 % vzorku vykazuje inzerci jednoho nukleotidu. Klon 40 (Obr. 14C) obsahuje delecí 1 nukleotidu. 66 % osekvenovaného vzorku mělo delecí cytosinu a 35 % vzorku mělo

deleci guaninu. Všechny tři klony vykazují posun čtecího rámce o jeden nukleotid. Tím pádem vzniká nefunkční protein nebo se objevuje stop kodon a translace se předčasně zastaví.

Na sekvenaci byly poslány i TLR-4 AB klony, konkrétně šlo o klony 12, 38 a 70 (viz obr. 15). Na sekvenci klonu 12 (Obr. 15A) je vidět, že nedochází k posunu čtecího rámce. U tohoto klonu dochází na jedné alele k inzerci 3 nukleotidů a na druhé k deleci 9 nukleotidů. Klon 12 tedy produkuje TLR-4 protein který má navíc 1 aminokyselinu nebo mu 3 aminokyseliny chybí. Je tedy pravděpodobné, že protein je funkční. U klonů 38 a 70 (Obr. 15 B, C) nebyla zjištěna mutace v sekvenci *tlr-4*, je tedy jasné, že produkují funkční TLR-4.

Během experimentů byly získány i tři potenciální TLR-4^{-/-} klony pomocí gRNA TLR-4 EF. Jednalo se o klony 15, 23 a 31. Tyto klony nejsou ještě osekvenovány, nemůžeme tedy s jistotou říct, zdali se jedná úspěšnou KO mutaci.



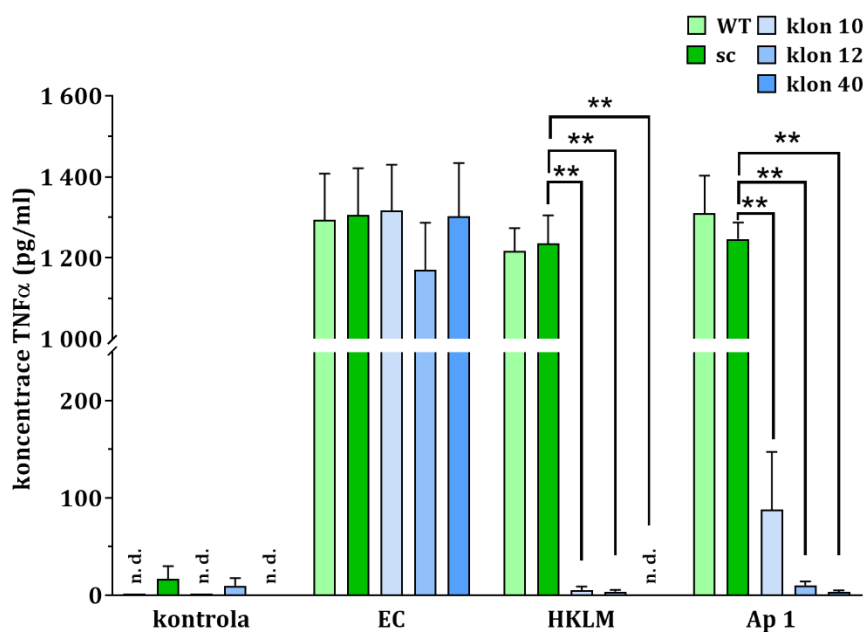


Obr. 15 Sekvence potenciálních TLR4^{-/-} klonů získaných pomocí gRNA TLR-4 AB
A: Klon 12. **B:** Klon 38. **C:** Klon 70.

9.6 TLR-2 klony po expozici Ap1

Z dosavadních výsledků naší skupiny se ukazuje, že sinicový LPS axenické kultury *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905 (Ap1) má prozánětlivý účinek. Tato data nejsou zatím publikována. Protože zatím nebyl připraven úspěšný TLR-4^{-/-} klon, byly experimenty provedeny pouze na TLR-2^{-/-} klonech. Na zjištění mechanismu signalizace tohoto LPS byly jako kontroly použity naivní buňky (WT), tak buňky nesoucí prázdný plazmid (scrambled kontrola – sc). Pro aktivaci buněk byl použit jak modelový ligand TLR-4 LPS *E. coli* (EC, 100 µg/ml), tak modelový ligand TLR-2 HKLM (10⁸ bakterií/ml).

Expozice EC, HKLM i Ap1 vedla k produkci TNFα u WT i SC kontrol. Expozice EC vedla k produkci TNFα i u všech TLR-2^{-/-} klonů. Spuštění prozánětlivé odpovědi na expozici EC u THP-1 tedy není závislé na TLR-2. Narozdíl od EC, HKLM i Ap-1 nebyly schopny aktivovat produkci TNFα nebo došlo jen nevýznamnému navýšení TNFα u TLR-2^{-/-} klonů. Je tedy zřejmé, že TLR-2 hraje hlavní nebo minimálně velmi významnou roli v signalizaci Ap-1 stejně, jako je tomu u modelového ligandu tohoto receptoru HKLM. Pro vyhodnocení dat byly klony porovnávány vůči sc kontrole, jelikož tyto buňky byly vystaveny stejným stresovým faktorům, a byly kultivovány stejným způsobem jako připravené klony.



Obr. 16 TLR-2^{-/-} klony po expozici Ap1

Stanovení produkce cytokinu TNF α pomocí metody ELISA po 6 hodinové stimulaci Ap1 (100 μ g/ml). Negativní „kontrola“ byla bez přidaného ligandu. Kontrola „EC“ obsahovala přidaný LPS *E. coli* (100 μ g/ml), kontrola „HKLM“ obsahovala přidaný HKLM (10⁸ bakterií/ml). Významnost je určena díky testu dvoucestná ANOVA, kdy byly porovnány klony vůči sc **p<0,01; n=4. wt – wild type THP-1, sc – scrambled kontrola THP-1, n. d. – nedetekovatelné

10 Diskuze

Hlavními cíli této diplomové práce bylo zjistit, 1/ zda LPS sinicových vodních květů dokáží vyvolat zánět a 2/ připravit TLR-4^{-/-} a TLR-2^{-/-} klony THP-1 buněk k ověření, zda LPS sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905 signalizuje přes TLR-4 jako klasický bakteriální LPS nebo přes TLR-2.

V rámci expozice kokultury Caco-2/PBMC LPS sinicových vodních květů byly sledovány změny v produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8, CCL2, CCL20 a protizánětlivého cytokinu IL-10. Produkce těchto cytokinů byla sledována i v podobném kokulturním modelu ve studii Parlesak *et al.*, kde na kokulturu Caco-2/PBMC aplikovali LPS nepatogenní *E. coli* (Parlesak *et al.*, 2004). Všechny cytokiny byly měřené z bazolaterálního média, IL-8 byl měřen i v apikálním médiu. U IL-8 byl statisticky významný nárůst jeho exprese u vzorků obsahujících dominující sinicové druhy *Dolichospermum flos-aquae* a *Planktothrix agardhii*. Zvýšená exprese cytokinu IL-8 Caco-2 buňkami po stimulu LPS sinicových vodních květů s dominujícími sinicemi druhu *Dolichospermum* a *Planktothrix* byla vidět i ve studii Skočková *et al.* V této studii byla naměřena vyšší produkce IL-8 Caco-2 buňkami oproti námi naměřené koncentraci v apikálním médiu (Skočková *et al.*, 2023). Podobný rozdíl zaznamenali i ve studii Pozo-Rubio *et al.* a souvisí s tím, že Caco-2 buňky prokudují cytokiny i do bazolaterálního média. Tím se aktivují PBMC a dochází k amplifikaci odpovědi (Pozo-Rubio *et al.*, 2011). U IL-6 došlo ke statisticky významnému nárůstu jeho exprese ve vzorku obsahujícím dominující sinici *Planktolyngbya limnetica*. V tomto vzorku byl v malé míře zastoupen i druh *Dolichospermum flos-aquae*, se kterým by mohl nárůst exprese cytokinu též souviset. Z dosažených výsledků se předpokládá, že LPS sinicových vodních květů s dominujícím druhem *Dolichospermum flos-aquae* by mohl mít prozánětlivý účinek na buňky. Velké odchylky u některých prezentovaných vzorků mohou být důsledkem odlišnosti PBMC od jednotlivých dárců. Ve studii Li *et al.*, jsou popsány rozdíly mezi jednotlivými dárci v produkci cytokinů buňkami izolovanými z krve (Li *et al.*, 2016).

Dále byla v rámci kokultury Caco-2/PBMC u vzorků se statisticky významným nárůstem exprese cytokinů sledována produkce proteinů těsných spojů, konkrétně claudinu 2, claudinu 4, occludinu a ZO-1. Tyto proteiny mají úlohu ve funkčních vlastnostech střevní epitelové bariéry. Změna uspořádání a produkce proteinů těsných spojů souvisí s porušením střevní bariéry. (O'Hara and Buret, 2008). Změny v produkci proteinů těsných spojů v reakci na sinicové toxiny zaznamenali ve studii Vašíček *et al.*, kdy po expozici Caco-2 buněk lipopeptidu puwainaphycinu došlo ke zvýšení produkce claudinu 4 (Vašíček *et al.*, 2020). Ve studii Capaldo *et al.* ukázali na modelu Caco-2 buněk významnou roli strukturních změn v těsných spoích po aplikaci cytokinů, které dokáží snížit bariérovou funkci epitelové vrstvy. Po této aktivaci došlo ke vzájemné kompetici claudinu 4 a claudinu 2 (Capaldo *et al.*, 2014). V rámci naší analýzy nebyla zaznamenána statisticky významná změna v produkci proteinů těsných spojů. Znamená to, že stimulace Caco-2 buněk LPS sinicových vodních květů neovlivnila integritu buněčné bariéry.

V rámci kokultury Caco-2/PBMC se též sledovala aktivace monocytů, popřípadě jejich diferenciaci do makrofágů, po stimulaci kokultury LPS sinicových vodních květů. Po aktivaci a diferenciaci monocytů je vidět zvýšení povrchového markeru CD16 i u studie Bayik *et al.* (Bayik *et al.*, 2017). Byla vidět statisticky významně zvýšená exprese CD16 u vzorku G a kontroly EC oproti ostatním vzorkům v porovnání s negativní „kontrolou“.

Z výsledků lze předpokládat, že LPS sinicových vodních květů s dominujícím druhem *Dolichospermum flos-aquae* může aktivovat Caco-2 buňky, které následně spustí imunitní reakci vedoucí k aktivaci monocytů.

V první části práce jsou použity LPS izolované z vodních květů a prozánětlivý efekt může být způsobený i heterotrofními gramnegativními bakteriemi. V naší laboratoři disponujeme i vzorky sinicových LPS izolovaných z axenických sinicových kultur, které neobsahují žádné gramnegativní bakterie. V této práci byl pro studium mechanismu signalizace sinicového LPS použit vzorek izolovaný z *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905 (Ap1). V naší laboratoři již bylo ukázáno, že Ap1 má prozánětlivých účinek na

myší makrofágy, střevní epiteliální buňky (enterocyty) a keratinocyty. Tato data ještě nejsou publikována. Není však jisté, zda Ap1 nebo jiné sinicové LPS prozánětlivě aktivují tyto buňky stejným způsobem jako bakteriální LPS, tedy přes TLR-4 (Chorus and Welker, 2021), nebo využívá jiný receptor.

Součástí této práce tedy byla příprava TLR-4^{-/-} a TLR-2^{-/-} klonů. Jak bylo zmíněno výše, TLR-4 je typický receptor pro bakteriálního LPS (Chorus and Welker, 2021). Ovšem jsou známy případy, kdy signalizace bakteriálního LPS není omezena pouze na TLR-4. Konkrétně se jedná o LPS bakterie *Leptospira interrogans* a *Rhizobium* spp., které indukují zánětlivé reakce v imunitních buňkách skrze TLR-2 (Werts *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2003). Tyto atypické LPS mají odlišnou strukturu od typického LPS *E. coli*. Vzhledem k tomu, že sinice též vykazují odlišnou strukturu LPS (Chorus and Welker, 2021), tak předpokládáme, že by mohly signalizovat přes stejný receptor, tedy TLR-2. Pro studium mechanismů je nejjednodušší využít imunitní buňky, které exprimují velké množství TLR, proto byla v této práci použita buněčná monocytární linie THP-1).

Pomocí CRISPR-Cas9 byla do THP-1 buněk vnesena gRNA do cílové sekvence genu, čímž by mělo dojít k potenciální KO mutaci (Gupta *et al.*, 2019). Zmíněnou metodu použili i ve studii Schary *et al.* k narušení genu *TLR4* a snížili tak prozánětlivou polarizaci mezenchymálních stromálních buněk a tím zlepšili remodelaci a hojení tkáně po infarktu u myší (Schary *et al.*, 2023).

Potenciální úspěšnost přípravy TLR-4^{-/-} klonů byla testována pomocí odpovídavosti na modelový ligand LPS *E. coli*. Přestože byla u některých klonů připravených pomocí gRNA TLR-4 AB pozorována po aktivaci produkce TNF α téměř na úrovni negativní kontroly, sekvenace nepotvrdila úspěšnou KO mutaci. Proto byly navrženy nové gRNA cílící na jiné místo v *TLR4* genu. U některých klonů připravených pomocí gRNA TLR-4 EF byla též pozorována po stimulaci produkce TNF α téměř na úrovni negativní kontroly. Úspěšnost KO mutace zatím nebyla potvrzena, protože klony ještě nebyly poslány na sekvenaci. Možným důvodem, proč je problém vyrobit KO TLR-4 klony, by mohlo být to, že je těžké navrhnout vhodnou gRNA cílící na exon 3. Exon 3 je kódující sekvence proteinu, která se nachází ve všech variantách TLR-4. I v již

zmíněné studii Schary *et al.* též cílili gRNA na exon 3, použili gRNA která je až v polovině exonu 3, ale přesto jim fungovala (Schary *et al.*, 2023). V naší laboratoři máme k dispozici 5 různých gRNA, mezi kterými je i gRNA z předchozí studie a tyto gRNA se postupně testují.

Potenciální úspěšnost přípravy TLR-2^{-/-} klonů byla testována pomocí odpovídavosti na modelový ligand HKLM. THP-1 monocyty narozdíl od makrofágů neexprimují na svém povrchu TLR-2 (Mittar, Paramban and McIntyre, 2011), bylo tedy nutné buňky nejdříve diferencovat do M0 makrofágů pomocí PMA, stejně jako ve studii Chanput *et al.* (Chanput *et al.*, 2013). Ze získaných klonů měly dvě třetiny sníženou odpovídavost na modelový ligand. Tři nejméně odpovídavé klony byly poslány na sekvenaci a byla u nich potvrzena KO mutace. S těmito klony byly provedeny následné experimenty na zjištění mechanismu signalizace sinicového LPS.

Odpověď TLR-2^{-/-} klonů po expozici LPS z *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905 byla významně snížena oproti sc kontrole, ve dvou případech srovnatelná s negativní kontrolou. Stejný trend byl pozorován i u TLR-2 ligandu HKLM. Naopak po stimulaci LPS *E. coli*, hlavním ligandem TLR-4, nebyl u klonů patrný rozdíl v odpovědi. Dle tohoto výsledku víme, že funkce TLR-4 nebyla narušena. Zdá se tedy, že TLR-2 je hlavním receptorem pro *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905. Jak už bylo popsáno výše, určité bakteriální LPS s atypickou strukturou signalizují přes TLR-2 (Werts *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2003). Náš výsledek podporuje předpoklad, že by sinicové LPS mohly signalizovat též přes TLR-2. Ale abychom mohli říct s jistotou, že TLR-2 je hlavní receptor pro toto sinicové LPS, bylo by vhodné porovnání s TLR-4^{-/-}, které zatím nejsou k dispozici.

11 Závěr

Tato diplomová práce měla dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo zjistit, zda LPS sinicových vodních květů mají prozánětlivý účinek a mohou tak mít negativní vliv na lidské zdraví. Druhým cílem bylo připravit TLR-4 a TLR-2 KO klony buněk THP-1, abychom zjistili mechanismus signalizace LPS axenické sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905.

V první části byla kokultura Caco-2 buněk a PBMC stimulována vybranými LPS sinicových vodních květů. U vzorku s dominujícím druhem sinice *Dolichospermum flos-aquae* došlo ke statisticky významnému nárůstu exprese prozánětlivých cytokinů. Analýza proteinů těsných spojů nepotvrdila narušení bariérové funkce. Též byla provedena analýza aktivace monocytů a u vzorku s již zmíněným druhem došlo ke zvýšení povrchové exprese CD16. Tyto výsledky ukazují, že LPS sinicových vodních květů s dominujícím druhem *Dolichospermum flos-aquae* byl mohl mít prozánětlivý účinek.

V druhé části byly připravovány TLR-4 a TLR-2 KO klony THP-1 buněk. Po testování odpovídavosti na stimul byly nejméně odpovídavé klony poslány na sekvenaci. U první části klonů TLR-4 nebyla potvrzena KO mutace, druhá část klonů TLR-4 nebyla do ukončení diplomové práce na sekvenaci poslána. U klonů TLR-2 byla potvrzena úspěšná KO mutace u tří klonů. S těmito třemi klony byl následně proveden experiment s expozicí Ap1. Klony ztratily schopnost po stimulu LPS aktivovat produkci TNF α , stejně tak tomu bylo i po stimulu HKLM, což je modelový ligand TLR-2. Vzhledem k tomu, že nemáme TLR-4^{-/-} klony, tak nemůžeme říci s jistotou, že LPS sinice *Aphanizomenon flos-aquae* PCC 7905 signalizuje výhradně přes TLR-2 receptor. Nicméně naše výsledky tuto hypotézu výrazně podporují.

Literatura

- 1 Babini, G. *et al.* (2018) 'A Co-culture Method to Investigate the Crosstalk Between X-ray Irradiated Caco-2 Cells and PBMC', *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (131), p. 56908. Available at: <https://doi.org/10.3791/56908>.
- 2 Barrangou, R. *et al.* (2007) 'CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes', *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), pp. 1709–1712. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- 3 Bayik, D. *et al.* (2017) 'Regulation of the maturation of human monocytes into immunosuppressive macrophages', *Blood Advances*, 1(26), pp. 2510–2519. Available at: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011221>.
- 4 Betsou, F. *et al.* (2019) 'Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications', *Current Pathobiology Reports*, 7(2), pp. 17–27. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00192-8>.
- 5 Bláha, L., Babica, P. and Maršálek, B. (2009) 'Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks', *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2), pp. 36–41. Available at: <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>.
- 6 Boyette, L.B. *et al.* (2017) 'Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets', *PLOS ONE*, 12(4), p. e0176460. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176460>.
- 7 Breinlinger, S. *et al.* (2021) 'Hunting the eagle killer: A cyanobacterial neurotoxin causes vacuolar myelinopathy', *Science (New York, N.Y.)*, 371(6536), p. eaax9050. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aax9050>.
- 8 Buratti, F.M. *et al.* (2017) 'Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation', *Archives of Toxicology*, 91(3), pp. 1049–1130. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.
- 9 Capaldo, C.T. *et al.* (2014) 'Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins', *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), pp. 2710–2719. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0773>.

- 10 Chanput, W. *et al.* (2013) 'Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds', *Food & Function*, 4(2), pp. 266–276. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2FO30156C>.
- 11 Chanput, W., Mes, J.J. and Wichers, H.J. (2014) 'THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach', *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>.
- 12 Chorus, I. and Welker, M. (eds) (2021) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, an imprint of Informa.
- 13 Chun, K.-H. and Seong, S.-Y. (2010) 'CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP', *International Immunopharmacology*, 10(1), pp. 98–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.10.002>.
- 14 Ciesielska, A., Matyjek, M. and Kwiatkowska, K. (2021) 'TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(4), pp. 1233–1261. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>.
- 15 Čihák, R. (2004) *Anatomie*. 2., upr. a dopl. vyd. /. Grada,.
- 16 Deyell, M., Ameta, S. and Nghe, P. (2019) 'Large scale control and programming of gene expression using CRISPR', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 96, pp. 124–132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.013>.
- 17 Durai, P., Batool, M. and Choi, S. (2015) 'Structure and Effects of Cyanobacterial Lipopolysaccharides', *Marine Drugs*, 13(7), pp. 4217–4230. Available at: <https://doi.org/10.3390/md13074217>.
- 18 Duval, K. *et al.* (2017) 'Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture', *Physiology*, 32(4), pp. 266–277. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- 19 Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. and Poxton, I.R. (2002) 'Structure and function of lipopolysaccharides', *Microbes and Infection*, 4(8), pp. 837–851. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0).
- 20 Forrester, M.A. *et al.* (2018) 'Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens', *Cellular immunology*, 332, pp. 58–76. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.008>.

-
- 21 Gault, P.M. and Marler, H.J. (eds) (2009) *Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*. New York: Nova Science Publishers (Bacteriology research developments series).
- 22 Girard, R. *et al.* (2003) 'Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2', *Journal of Cell Science*, 116(2), pp. 293–302. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.00212>.
- 23 Gupta, D. *et al.* (2019) 'CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing', *Life Sciences*, 232, p. 116636. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>.
- 24 Gupta, S.K. and Shukla, P. (2017) 'Gene editing for cell engineering: trends and applications', *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), pp. 672–684. Available at: <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1214557>.
- 25 Häcker, H. *et al.* (2006) 'Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6', *Nature*, 439(7073), pp. 204–207. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04369>.
- 26 He, C. *et al.* (2019) 'Vitamin A inhibits the action of LPS on the intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins', *Food & Function*, 10(2), pp. 1235–1242. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8FO01123K>.
- 27 He, X. *et al.* (2016) 'Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment', *Harmful Algae*, 54, pp. 174–193. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>.
- 28 Herrero, A. and Flores, E. (eds) (2008) *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- 29 Hoiczyk, E. (2000) 'Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations', *Archives of Microbiology*, 174(1), pp. 11–17. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002030000187>.
- 30 Hoiczyk, E. and Hansel, A. (2000) 'Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope', *Journal of Bacteriology*, 182(5), pp. 1191–1199.
- 31 Hořejší, V. (2017) *Základy imunologie* /. 6., aktualizované vydání. Stanislav Juhaňák - Triton,.
- 32 Huisman, J. *et al.* (2018) 'Cyanobacterial blooms', *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), pp. 471–483. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.

- 33 Kalina, T. and Váňa, J. (2005) *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii* /. Vyd. 1. Karolinum,.
- 34 Kapałczyńska, M. *et al.* (2018) '2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures', *Archives of Medical Science : AMS*, 14(4), pp. 910–919. Available at: <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.
- 35 Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) 'Toll-Like Receptor Signaling Pathways', *Frontiers in Immunology*, 5, p. 461. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- 36 Khouzam, J.P.S. and Tivakaran, V.S. (2021) 'CRISPR-Cas9 Applications in Cardiovascular Disease', *Current Problems in Cardiology*, 46(3), p. 100652. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100652>.
- 37 King, R.C. (2006) *A dictionary of genetics* /. 7th ed. Oxford University Press,.
- 38 Kleiveland, C.R. (2015) 'Peripheral Blood Mononuclear Cells', in K. Verhoeckx *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/> (Accessed: 2 May 2023).
- 39 Komárková, J. (2014) *Nebezpečné vodní květy*, *Časopis Vesmír*. Available at: <https://vesmir.cz/cz/on-line-clanky/2014/07/nebezpecne-vodni-kvety.html> (Accessed: 4 May 2023).
- 40 Konrádová, V., Uhlík, J. and Vajner, L. (2000) *Funkční histologie* /. 2. vyd. H & H,.
- 41 Kordulewska, N.K. *et al.* (2020) 'Modulatory Effects of Osthole on Lipopolysaccharides-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayer and Co-Cultures with THP-1 and THP-1-Derived Macrophages', *Nutrients*, 13(1), p. 123. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13010123>.
- 42 Krause, G. *et al.* (2008) 'Structure and function of claudins', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), pp. 631–645. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.10.018>.
- 43 Kubickova, B. *et al.* (2019) 'Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system', *Environmental Sciences Europe*, 31(1), p. 31. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>.
- 44 Lea, T. (2015) 'Caco-2 Cell Line', in K. Verhoeckx *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/> (Accessed: 2 May 2023).

-
- 45 Lee, B., Moon, K.M. and Kim, C.Y. (2018) 'Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals', *Journal of Immunology Research*, 2018, p. 2645465. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>.
- 46 Lee, S.H. (2015) 'Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases', *Intestinal Research*, 13(1), pp. 11–18. Available at: <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>.
- 47 Lehner, R. *et al.* (2020) 'A novel 3D intestine barrier model to study the immune response upon exposure to microplastics', *Archives of Toxicology*, 94(7), pp. 2463–2479. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02750-1>.
- 48 Li, Y. *et al.* (2016) 'A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans', *Cell*, 167(4), pp. 1099–1110.e14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.017>.
- 49 Liao, C. and Beisel, C.L. (2021) 'The tracrRNA in CRISPR biology and technologies', *Annual review of genetics*, 55, pp. 161–181. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-022559>.
- 50 Liu, Y. *et al.* (2014) 'TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 47(2), pp. 136–147. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8402-y>.
- 51 Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. and Ohashi, P.S. (2008) 'LPS/TLR4 signal transduction pathway', *Cytokine*, 42(2), pp. 145–151. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- 52 Luissint, A.-C., Parkos, C.A. and Nusrat, A. (2016) 'Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte–Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair', *Gastroenterology*, 151(4), pp. 616–632. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.008>.
- 53 Macagno, A. *et al.* (2006) 'A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression', *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), pp. 1481–1492. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20060136>.
- 54 Mankertz, J. *et al.* (2000) 'Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma', *Journal of Cell Science*, 113(11), pp. 2085–2090. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.2085>.

- 55 Marraffini, L.A. and Sontheimer, E.J. (2010) 'CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea', *Nature reviews. Genetics*, 11(3), pp. 181–190. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2749>.
- 56 Maršálek, B. (2002) *Živa – Sinice jako producenti biologicky aktivních látek* (Blahoslav Maršálek). Available at: <https://ziva.avcr.cz/2002-5/sinice-jako-producenti-biologicky-aktivnich-latek.html> (Accessed: 4 May 2023).
- 57 Mehta, K.K., Evitt, N.H. and Swartz, J.R. (2015) 'Chemical lysis of cyanobacteria', *Journal of Biological Engineering*, 9, p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0007-y>.
- 58 Mittar, D., Paramban, R. and McIntyre, C. (2011) 'Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation'. Application Note. Available at: <https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/Flow%20Cytometry%20and%20High-Content%20Imaging%20to%20Identify%20Markers%20of%20Monocyte-Macrophage%20Differentiation.pdf> (Accessed: 11 May 2023).
- 59 Moore, J.D. (2015) 'The impact of CRISPR–Cas9 on target identification and validation', *Drug Discovery Today*, 20(4), pp. 450–457. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.12.016>.
- 60 Murphy, K. and Weaver, C. (2016) *Janeway's immunobiology / Kenneth Murphy, Casey Weaver ; with contributions by Allan Mowat, Leslie Berg, David Chaplin*. 9th edition. Garland Science,.
- 61 Naydenov, N.G. *et al.* (2013) 'Novel mechanism of cytokine-induced disruption of epithelial barriers', *Tissue Barriers*, 1(4), p. e25231. Available at: <https://doi.org/10.4161/tisb.25231>.
- 62 O'Hara, J. and Buret, A. (2008) 'Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection', *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, pp. 7008–21. Available at: <https://doi.org/10.2741/3206>.
- 63 Parlesak, A. *et al.* (2004) 'Modulation of Cytokine Release by Differentiated CACO-2 Cells in a Compartmentalized Coculture Model with Mononuclear Leucocytes and Nonpathogenic Bacteria', *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(5), pp. 477–485. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01495.x>.
- 64 Patel, V.K. *et al.* (2019) 'CRISPR–Cas9 System for Genome Engineering of Photosynthetic Microalgae', *Molecular Biotechnology*, 61(8), pp. 541–561. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00185-3>.

-
- 65 Pozo-Rubio, T. *et al.* (2011) 'Immunostimulatory effect of faecal Bifidobacterium species of breast-fed and formula-fed infants in a peripheral blood mononuclear cell/Caco-2 co-culture system', *British Journal of Nutrition*, 106(8), pp. 1216–1223. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114511001656>.
- 66 Raetz, C.R.H. *et al.* (2009) 'Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story', *Journal of Lipid Research*, 50(Suppl), pp. S103–S108. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800060-JLR200>.
- 67 Raetz, C.R.H. and Whitfield, C. (2002) 'Lipopolysaccharide endotoxins', *Annual Review of Biochemistry*, 71, pp. 635–700. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
- 68 Schary, Y. *et al.* (2023) 'CRISPR-Cas9 editing of TLR4 to improve the outcome of cardiac cell therapy', *Scientific Reports*, 13(1), p. 4481. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31286-4>.
- 69 Sharif, O. *et al.* (2007) 'Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages', *BMC Immunology*, 8, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>.
- 70 Siliciano, J.D. and Goodenough, D.A. (1988) 'Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.', *Journal of Cell Biology*, 107(6), pp. 2389–2399. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2389>.
- 71 Skočková, V. *et al.* (2023) 'Cyanobacterial Harmful Bloom Lipopolysaccharides Induce Pro-Inflammatory Effects in Immune and Intestinal Epithelial Cells In Vitro', *Toxins*, 15(3), p. 169. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins15030169>.
- 72 Strašková, A. *et al.* (2019) 'Pigment-protein complexes are organized into stable microdomains in cyanobacterial thylakoids', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1860(12), p. 148053. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.07.008>.
- 73 Takeda, K. and Akira, S. (2004) 'TLR signaling pathways', *Seminars in Immunology*, 16(1), pp. 3–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>.
- 74 Tang, X. *et al.* (2018) 'Epidermal Growth Factor, through Alleviating Oxidative Stress, Protect IPEC-J2 Cells from Lipopolysaccharides-Induced Apoptosis', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), p. 848. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19030848>.

- 75 Tlaskalová-Hogenová, H. *et al.* (2002) 'Mucosal immunity: its role in defense and allergy', *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(2), pp. 77–89. Available at: <https://doi.org/10.1159/000059397>.
- 76 Tsukita, Sachiko *et al.* (2009) 'Roles of ZO-1 and ZO-2 in Establishment of the Belt-like Adherens and Tight Junctions with Paracellular Permselective Barrier Function', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1), pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04056.x>.
- 77 Ullah, M.O. *et al.* (2016) 'TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target', *Journal of Leukocyte Biology*, 100(1), pp. 27–45. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.2RI1115-531R>.
- 78 Vašíček, O. *et al.* (2020) 'Cyanobacterial lipopeptides puwainaphycins and minutissamides induce disruptive and pro-inflammatory processes in Caco-2 human intestinal barrier model', *Harmful Algae*, 96, p. 101849. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101849>.
- 79 Werts, C. *et al.* (2001) 'Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism', *Nature Immunology*, 2(4), pp. 346–352. Available at: <https://doi.org/10.1038/86354>.
- 80 Zhang, J.-H. *et al.* (2016) 'Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering', *Bioengineered*, 7(3), pp. 166–174. Available at: <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1189039>.
- 81 Znachor, P. (2005) 'Vodní květy řas a sinic', *Scientific American*, 21, pp. 236–243.

URL1: Svobodová, A. (2021) *Biologie: Sinice a řasy: Sinice neboli Cyanobacteria*. Available at: <https://isibalo.com/biologie/sinice-a-rasy/sinice-neboli-cyanobacteria> (Accessed: 4 May 2023).

URL2: *General information about harmful algal blooms* (2023) *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/habs/general.html> (Accessed: 4 May 2023).

URL3: Štefánek, J. (2022) *Tenké střevo - obecné informace, Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK*. Available at: <https://www.stefajir.cz/tenke-strevo-obecne-informace> (Accessed: 4 May 2023).