

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



Diplomová práce

**Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy  
*in vivo* a vliv klíštěcích cystatinů na genovou expresi  
interferon regulačních faktorů**

Bc. Jana Širmarová

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.  
Konzultanti: Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.  
RNDr. Daniel Růžek, PhD.

České Budějovice

2012

Širmarová, J., 2012: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy *in vivo* a vliv klíštěcích cystatinů na genovou expresi interferon regulačních faktorů. [The influence of tick saliva on the replication of tick-borne encephalitis virus *in vivo* and the influence of tick cystatins on gene expression of interferon regulated factors. Mgr. Thesis, in Czech.] – p.45, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: This study was focused on the influence of hard tick from *Ixodes ricinus* on the replication of tick-borne encephalitis virus *in vivo* and the on the accompanied changes in the levels of inflammatory cytokines which were determined in serum of infected mice. Further the effect of tick cystatins, the inhibitors of cysteine proteases, on gene expression of interferon regulated factors was investigated in dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor ligands.

Tato práce byla financována z grantu: 590/4016

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích 12. prosince 2012

.....  
Jana Širmarová

## Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli prof. Janu Kopeckému, že mi umožnil pracovat na tomto pro mě velmi zajímavém a někdy i trošku komplikovaném tématu. Obrovský dík patří Dr. Lieskové a Dr. Růžkovi, kteří mi byli velkou oporou a děkuji jim za cenné rady a pomoc při experimentech. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Laboratoře imunologie parazitóz za vytvoření přátelské atmosféry. Nesmím opomenout ani své rodiče, kteří mě také podporovali a stáli při mě.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Klíštěcích sliny.....	2
1.2. Virus klíštěcové encefalitidy (VKE) .....	4
1.3. Dendritické buňky.....	6
1.4. Toll-like receptory (TLR) .....	7
1.4.1. Signální dráhy aktivované Toll-like receptory.....	9
1.5. Interferon regulací faktory (IRF) .....	11
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>15</b>
3.1. Buněčné linie, virus KE, SialoL a SialoL2 .....	15
3.2. Odběr klíštěcích slin .....	15
3.3. Plaková titrace.....	16
3.4. Infekce myši virem klíštěcové encefalitidy .....	16
3.5. Stanovení koncentrace TNF $\alpha$ a IFN $\gamma$ v séru .....	17
3.6. Izolace dendritických buněk .....	18
3.7. Aktivace dendritických buněk TLR ligandy.....	18
3.8. Izolace RNA a syntéza komplementární DNA(cDNA) .....	18
3.9. Kvantitativní real-timePCR.....	18
3.10 Statistická analýza .....	20
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>21</b>
4.1. Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíštěcové encefalitidy <i>in vivo</i> ...21	
4.2. Vliv klíštěcích slin na koncentrace TNF $\alpha$ a IFN $\gamma$ v séru.....22	
4.3. Účinek cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF4a IRF7 v DC stimulovaných s LPS .....	25
4.4. Účinek cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF 4/IRF7 v DC stimulovaných ligandy Poly (I:C) a imiquimodem .....	27
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Souhrn</b> .....	<b>33</b>
<b>7. Seznam zkratk</b> .....	<b>34</b>
<b>8. Seznam literatury</b> .....	<b>35</b>

## 1. Úvod

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) patří mezi nejrozšířenější arboviry v Evropě. Nejčastější přenos tohoto viru je při sání infikovaným klíštětem, v našich podmínkách je to *Ixodes ricinus*. Infekce virem indukuje jak přirozenou, tak adaptivní imunitu. Klíštěcí sliny, jimiž se virus dostává do těla hostitele, obsahují různé farmakologicky aktivní látky, které mají protisrážlivé, vasodilatační, protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Z toho plyne, že právě klíštěcí sliny hrají důležitou roli v šíření virové infekce. V této práci jsme se pokusili zjistit, zda dochází k ovlivnění replikace VKE vlivem sání klíšťat *in vivo*.

Dendritické buňky představují první cíl infekce VKE a patří mezi buňky produkující velké množství interferonu. Interferon má antivirové účinky a tedy hraje důležitou roli v kontrole replikace VKE. Virus KE zatím neznámými mechanismy dokáže překonávat tuto antivirovou kontrolu. To může být právě důsledkem klíštěcích slin, které jak se ukázalo, mají vliv na interferonovou signální dráhu. V našich experimentech jsme se zaměřili na interferon regulační faktory (IRF), které také hrají důležitou roli jak v regulaci interferonu a prozánětlivých cytokinů, tak i v maturaci dendritických buněk. Jednou z možností, jak jsou tyto IRF aktivovány je přes signální dráhy Toll-like receptorů (TLR). TLR receptory jsou exprimovány na povrchu dendritických buněk a váží na sebe různé motivy patogenů.

Naší snahou bylo zjistit, zda klíštěcí cystatiny ze slin ovlivňují expresi IRF a tím negativně ovlivňují regulaci interferonu a prozánětlivých cytokinů, čímž by se mohl částečně objasnit mechanismus unikání VKE antivirové kontrole.

## 1. 1 Klíštěcí sliny

Krev je pro klíšťata zdrojem obživy, a proto si musela vyvinout způsoby, kterými parazit překoná hostitelovy obranné mechanismy. Slinné žlázy produkují sliny obsahující látky, které mají protizánětlivé, vasodilatační, protisrážlivé a imunomodulační účinky. Tyto účinky usnadňují a umožňují úspěšné sání na hostiteli.

Klíštěcí sliny ovlivňují celou řadu buněk imunitního systému. Snižují produkci prozánětlivých cytokinů u makrofágů (Gwakisa a kol., 2001 a Ramachandra a kol., 1992), inhibují komplement, fagocytózu patogenů, aktivitu NK buněk a stejně tak i proliferaci T a B buněk (Francischetti a kol., 2010). Na splenocytech pocházejících z myší, na kterých sály nymfy *Ixodes scapularis* bylo demonstrováno, že sliny snižují produkci IL-2 a IFN $\gamma$  a naopak zvyšují produkci IL-4 a IL-10, tedy inhibují prozánětlivou Th1 imunitní odpověď a naopak pozitivně působí na Th2 imunitní odpověď (Schoeler a kol., 1999, Ferreira a kol., 1999).

Schopnost ovlivnění Th polarizaci směrem k Th2 byla prokázána i *ex vivo*. U dendritických buněk byla produkce IL-12 a TNF $\alpha$  snížena v přítomnosti klíštěcích slin (Cavassani a kol., 2005). IL-2 a IFN $\gamma$  produkované T-lymfocyty byly sníženy v přítomnosti extraktu ze slinných žláz klíštěte *Demacantor andersoni* (Ramachandra a kol., 1992).

Proteiny obsažené ve slinách mají schopnost omezovat správné fungování cytokinů, jež hrají velmi důležitou roli v celém systému prozánětlivých a imunitních dějů.

Slinami klíštěte *Ixodes ricinus* mohou být přenášeny různé patogeny, mezi ně patří i virus klíšťové encefalitidy, *Borrelia burgdorferi*, babésie (Wikel, 1996).

Slinami aktivovaný přenos (saliva activated transmission), krátce SAT efekt, je předpokládaným výsledkem imunomodulačních účinků klíštěcích slin v místě, kde je klíště přichyceno. Poprvé byl SAT efekt popsán u přenosu Togoto viru (Jones a kol., 1991). Přímý důkaz SAT účinku byl demonstrován tak, že když byl patogen aplikován do hostitele spolu s extraktem ze slinných žláz (SGE), byla pozorována u morčat zvýšená infekčnost pro klíšťata, než když byl patogen aplikován bez SGE (Nuttall a Labuda, 2004).

Jedním z prvních SAT faktorů byl identifikován imunosupresivní protein Salp15. Byl vyizolován z klíštěcích slin klíštěte *Ixodes scapularis* (Ramamoorthi a kol., 2005). Inhibuje imunitní odpověď CD4 $^{+}$  T-lymfocytů (Garg a kol., 2006). Mezi další imunosupresivní proteiny patří cystatiny.

Cystatiny s prozánětlivou a imunosupresivní aktivitou byly objeveny ve slinách *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis a kol., 2006).

Byly pojmenovány jako sialostatin L (SialoL) a sialostatin L2 (SialoL2) (Kotsyfakis a kol., 2006). Ukázalo se, že oba sialostatiny mají inhibiční účinky na katepsin L a nemají žádný inhibiční účinek na katepsin B a H (Kotsyfakis a kol., 2007). Sialostatin L navíc silně inhibuje katepsin S narozdíl od SialoL2, která tento katepsin S inhibuje velmi slabě, ale je naopak spojován s úspěšným sáním klíštěte (Kotsyfakis a kol., 2007). SialoL má inhibiční účinek na LPS indukovanou maturaci DC. Vlivem SialoL byl pozorován pokles produkce TNF $\alpha$  a IL-12 v dendritických buňkách a také byla snížena upregulace kostimulačních molekul (Sa-Nunes a kol., 2009). Byl pozorován inhibiční účinek SialoL na interferonovou signální dráhu v DC (nepublikovaná data). SialoL2 se podílí na úspěšném saní klíštěte (Kotsyfakis a kol., 2008). A právě SialoL2 se dá také považovat za SAT faktor, neboť jeho přítomnost výrazně pozitivně ovlivnila růst *Borrelia burgdorferi* v kůži po jeho subkutánní aplikaci do kůži *in vivo* společně s boréliemi (Kotsyfakis a kol., 2008).

Jsou známy další konkrétní proteiny ze slin klíšťat různých druhů. Níže jsou zmíněny některé z nich, u nichž byl také prokázán vliv na buňky imunitního systému a na cytokiny hrající důležitou roli v imunitních dějích.

Iris protein byl nalezen ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* působící jako imunosupresor, který inhibuje produkci několika prozánětlivých cytokinů (Leboulle a kol., 2002).

Dále byl ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* nalezen protein vázající IL-2 a tím snižující jeho dostupnost pro ovlivnění T buněčné proliferace (Gillespie a kol., 2001).

Evasin-1, nalezený ve slinách *Rhipicephalus sanguineus* (Frauenschuh a kol., 2007), je charakterizován jako protein vázající se na chemokiny. Chemokiny jsou malé proteiny, které jsou klíčové pro migraci buněk do místa poškození. Jejich gradient ovlivňuje právě buněčnou migraci a jeho změnou dochází k ovlivnění exprese jejich receptorů na různých typech buněk (Mantovani a kol., 2004). Mezi chemokiny patří IL-8, jež je hlavním mediátorem pro migraci neutrofilů a eotaxin, který je důležitý pro chemotaxi eosinofilů. Receptory pro tyto chemokiny na svém povrchu exprimují i žírné buňky a bazofily (Lippert a kol., 1998). Právě tyto zmíněné buňky jsou ve velkém počtu přítomny v místě sání klíštěte. Anti-chemokinová aktivita byla zjištěna i v extraktuze slinných žláz klíšťat *Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum* a *Ixodes ricinus* (Hajnická a kol., 2005).

V neposlední řadě prostaglandin E2 nalezený ve slinách inhibuje maturaci dendritických buněk a s tím související schopnost aktivovat T buněčnou proliferaci (Sa-Nunes a kol., 2007). Slinami klíštěte *Ixodes ricinus* mohou být přenášeny různé patogeny, mezi ně patří i virus klíšťové encefalitidy, kterému se bude věnovat následující kapitola.

## 1.2 Virus klíšťové encefalitidy (VKE)

VKE spadá do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Je jedním z mnoha arbovirů vyskytujících se v Evropě a v Asii a je členěn do 3 subtypů: evropského, sibiřského a dálněvýchodního (Grard a kol., 2007). V našich podmínkách se vyskytuje evropský subtyp, který je přenášen klíšťem *Ixodes ricinus*. Klíšť slouží jako vektor VKE. Hlavním hostitelem a reservoárem jsou menší obratlovci, jež jsou kompetentní pro dostatečnou replikaci VKE a i následný přenos na sající klíšťata. Člověk je náhodným hostitelem pro klíšťe a virem se nakazí sáním infikovaného klíšťe, který se do těla dostává v klíšťcích slinách (Dörrbecker a kol., 2010).

Klíšťovou encefalitidou onemocní v Evropě ročně přibližně 2000 lidí (Süss, 2008). Průběh onemocnění evropským subtypem VKE probíhá u 72% případů symptomaticky ve dvou fázích. Inkubační doba je obvykle 7 až 14 dní, po ní je viremická fáze, která je charakterizována nespecifickými symptomy, které připomínají chřipku. Poté následuje období přibližně jednoho týdne, kdy je člověk asymptomatický, pak nastane druhá fáze onemocnění, která se projevuje horečkami, bolestí hlavy, meningitidou nebo meningoencefalitidou. Úmrtnost u tohoto subtypu VKE je velmi nízká 1–2% ve srovnání se zbylými subtypy VKE (Logar a kol., 2000).

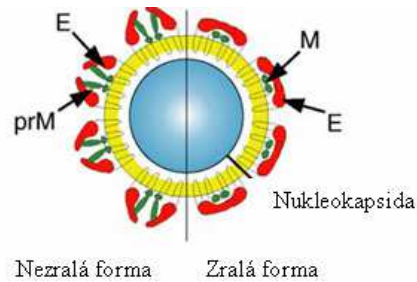
V dnešní době existuje účinné očkování proti evropskému subtypu VKE, založené na užití inaktivovaného viru formaldehydem (Kunz, 2003).

Viriony viru klíšťové encefalitidy jsou kulovitého tvaru, malé a obalené částice (Obr. 1. 1). Povrch virionu je tvořen fosfolipidovou vrstvou, na které jsou povrchové proteiny – M (membrane) a E (envelope) tvořící dimer a M protein, jehož prekurzorem je prM. Vnitřek virové částice tvoří nukleokapsida, jež obsahuje kapsidový protein C a jednořetězcovou molekulu RNA pozitivní polaritě o velikosti 11 kb, která není zakončena poly(A) sekvencí (Mandl, 2005).

Virové proteiny jsou kódovány v jednom čtecím rámci (Open Reading Frame - ORF) a tvoří polyprotein, jež je kotranslačně a posttranslačně štěpen buněčnými a virovými proteázami na jednotlivé virové proteiny a to na 3 strukturální (C, M, E) a 7 nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Tyto proteiny jsou v polyproteinu uspořádány následovně:

**5'-C-prM-E-NS1- NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'** (Lindenbach a kol., 2003).

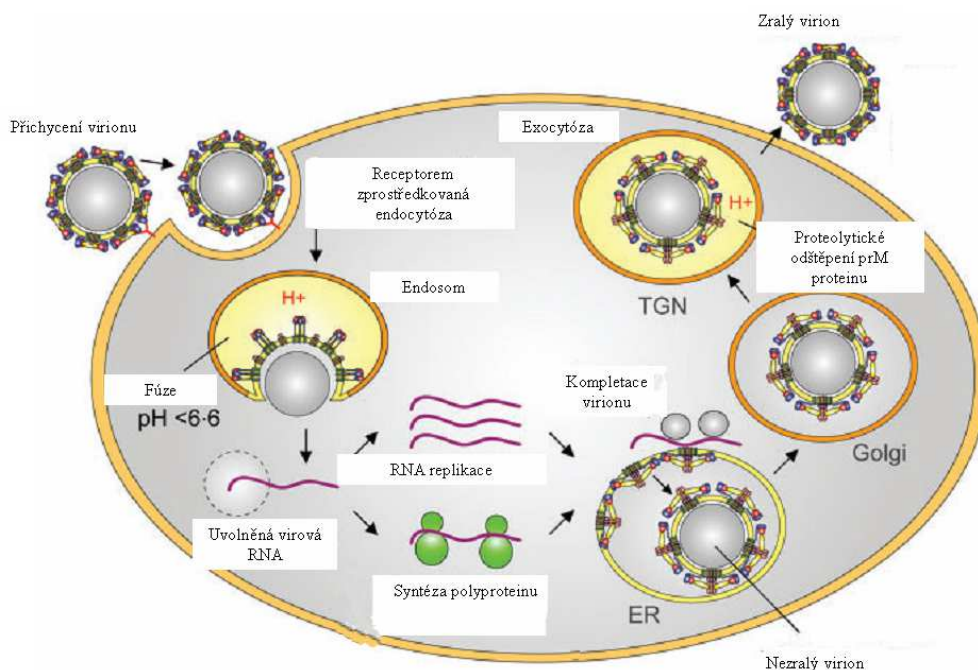




Obr.1. 1 Stavba virové částice. Povrchové proteiny –M (membrane) a E (envelope) tvoří dimer a M protein, jehož prekurzorem je prM (Mandl, 2005).

Replikace viru klíšťové encefalitidy je na Obr. 1. 2.

Virová částice vstupuje do buňky endocytózou zprostředkovanou skrze receptor, dostane se do endozomu, kde v důsledku kyselého pH dojde k membránové fúzi E proteinu s membránou endozomu a tím k uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy buňky. V cytoplasmě se z nukleokapsidy uvolní virová jednořetězová RNA a je zahájena replikace viru. Zkompletování viru se děje v endoplazmatickém retikulu a v něm vznikne nezralá virová částice (obsahující prM protein) a v trans Golgiho aparátu virová částice maturuje a to tak, že pr fragment M proteinu je odštěpen a E protein vytváří homodimer. Takto zralé a infekční částice jsou uvolňovány exocytózou ven z buňky (Stiasny a kol., 2006).



Obr. 1. 2 Replikační cyklus viru klíšťové encefalitidy (Stiasny a kol., 2006).

Zatím nejsou přesně popsány mechanismy, kterými VKE překonává přirozenou i adaptivní imunitu, také není moc známo jak přesně vstupuje do CNS a jak ji infekce poškozuje.

Ve skutečnosti všechny savčí buňky, které jsou infikovány jsou schopné rozeznat cizí patogeny skrze receptory tomu určené a to TLR receptory a cytoplazmatické RIG receptory (Takeuchi a kol., 2009). Detekcí patogenů těmito receptory se spouští mechanismy přirozené imunity, jejichž výsledkem je tvorba interferonů typu I, které jsou schopné navodit antivirový stav a slouží jako první obranná linie, jejímž výsledkem je aktivace syntézy více jak 300 buněčných proteinů brzo po infekci (Haller a kol., 2006).

Důležitými buňkami v imunitní obraně proti viru jsou dendritické buňky, které jsou potenciálním cílem VKE. Obecně po absorpci viru dendritickými buňkami dochází přes TLR signalizaci k jejich maturaci. Výsledkem je produkce chemokinů, prozánětlivých cytokinů, IFN typu I a ke zvýšené expresi MHC II molekul (Hellman a kol., 2007).

### **1.3 Dendritické buňky**

Reakce imunitního systému na přítomnost sajícího klíštěte začíná už v místě jeho sání. Klíště, aby mohlo sát, musí porušit fyzickou bariéru a tou je kůže. Jako první buňky imunitního systému se setkávají s klíštěčímí slinami keratinocyty, žírné buňky, dendritické buňky, makrofágy a eosinofily. Tyto buňky uvolňují mediátory, které podněcují migraci prozánětlivých buněk jako jsou třeba neutrofilů do místa sání klíštěte (Francischetti a kol., 2010).

Dendritické buňky jsou antigen prezentující buňky, které uvádí do pohybu děje vedoucí k adaptivní imunitní odpovědi. DC se vyskytují ve formě zralé a nezralé a tyto dvě formy se od sebe liší i funkčně. Nezralé DC jsou lokalizované v nelymfatických tkáních jako je kůže a mukóza, jejich hlavní funkcí je vylahčovat antigeny. Po rozeznání antigenu nezralé DC podstupují komplex procesů vedoucích k jejich zrání, které vyúsťuje k migraci z tkání do sekundárních lymfatických orgánů. Zároveň dochází k upregulaci MHC II komplexu a kostimulačních molekul, což je zásadní pro prezenci antigenu dendritickými buňkami T-lymfocytům (Liu a kol., 2001).

Dendritické buňky lze rozdělit na dvě kategorie, z nichž každá zahrnuje několik subtypů. Ty se od sebe výrazně liší, co se týká funkce, produkce cytokinů, exprese TLR a IRF.

První skupinou jsou konvenční DC (cDC), které mohou být dále děleny na migrující DC a lymfoidní DC. Migrující DC vychytávají antigeny v periferních tkáních a migrují lymfou do lymfatických uzlin, kde zpracovaný antigen prezentují T-lymfocytům (Bell a kol., 1999). Patří sem Langerhansovy buňky kůže, které se mohou nacházet i v epitelu střevního a dýchacího traktu (Romani a kol., 2003).

Lymfoidní DC jsou přímo v lymfatickém orgánu a v něm sbírají a prezentují antigen. Jsou to především DC buňky sleziny a thymu, které se mohou dělit na další subtypy.

Do druhé skupiny patří plazmocytoidní DC (pDC). Jsou to volně cirkulující buňky, které začnou produkovat velké množství interferonu typu I po virové či bakteriální infekci. Infekce také může způsobit, že tyto buňky získají schopnosti jako konvenční dendritická buňka a to prezentovat antigen (Liu a kol., 2005).

Proteiny v klíštěcích slinách mohou ovlivňovat vlastnosti a funkce DC. Ukázalo se, že sliny pocházející z klíštěte *Ixodes ricinus* inhibují DC maturaci vyvolanou ligandy virových TLR receptorů. Mimo jiné se ukázalo, že DC vyizolované z myši, kterým byly předtím injikovány sliny, mají zhoršenou funkci v prezenci antigenu (Skallová a kol., 2008).

## 1. 4 Toll-like receptory (TLR)

Toll receptory jsou transmembránové proteiny, které se evolučně vyvinuly od hmyzu až k savcům. Tyto receptory byly nejdříve identifikovány jako základní molekuly, které byly součástí embryonálního vývoje u drosofilu a také jako součást imunity proti onemocněním způsobeným houbami. Homologní rodina těchto receptorů existuje i u savců a odsud název Toll-like receptory (TLR).

TLR jsou spojovány s receptory pro cytokin IL-1, ale velmi se liší v extracelulární oblasti. TLR v této části obsahují konce bohaté na leucin, zatímco receptory pro IL-1 zde mají tři domény podobné imunoglobulinům (Takeda a kol., 2005).

TLR receptory rozpoznávají různé mikrobiální komponenty, které se nacházejí v membránách, buněčných stěnách, bílkovinách a v DNA mikrobů. Tyto součásti patogenů fungují jako spouštěče imunitní odpovědi, jež je zprostředkována skrze makrofágy, dendritické buňky a složky komplementu. Aktivací těchto imunitních buněk dochází k produkci cytokinů, chemokinů a následně i k aktivaci adaptivní imunity (Akira a kol., 2001)

Dodnes je zatím známo 11 členů TLR rodiny. Jednotlivé TLR lze rozdělit do dvou skupin a to podle jejich buněčné lokalizace a podle ligandu, které rozpoznávají. Na povrchu buněk jsou exprimovány tyto receptory TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR11. Rozpoznávají především komponenty mikrobiálních membrán a to jejich lipidy, lipoproteiny a proteiny. Ostatní receptory jako TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 jsou exprimovány v intracelulárním prostoru buňky a to buď ve váčcích endoplazmatického retikula, lyzozomech, endozomech a endolyzozomech, kde rozpoznávají nukleové kyseliny mikrobů (Obr. 1. 3) (Kawai a kol., 2010).

TLR1, TLR2 a TLR6 tvoří dimery mezi sebou.

TLR2 rozpoznává široké spektrum mikrobiálních komponentů, jako jsou např. lipoproteiny, lipopeptidy rozličných patogenů, peptidoglykany z Gram-pozitivních bakterií (Takeda a kol., 2003). To, že je schopen rozlišit tak variabilní množství složek pocházejících z mikrobů, je pravděpodobně tím, že TLR2 vytváří heterodimer s TLR1 či TLR6 (Saitoh a kol., 2004).

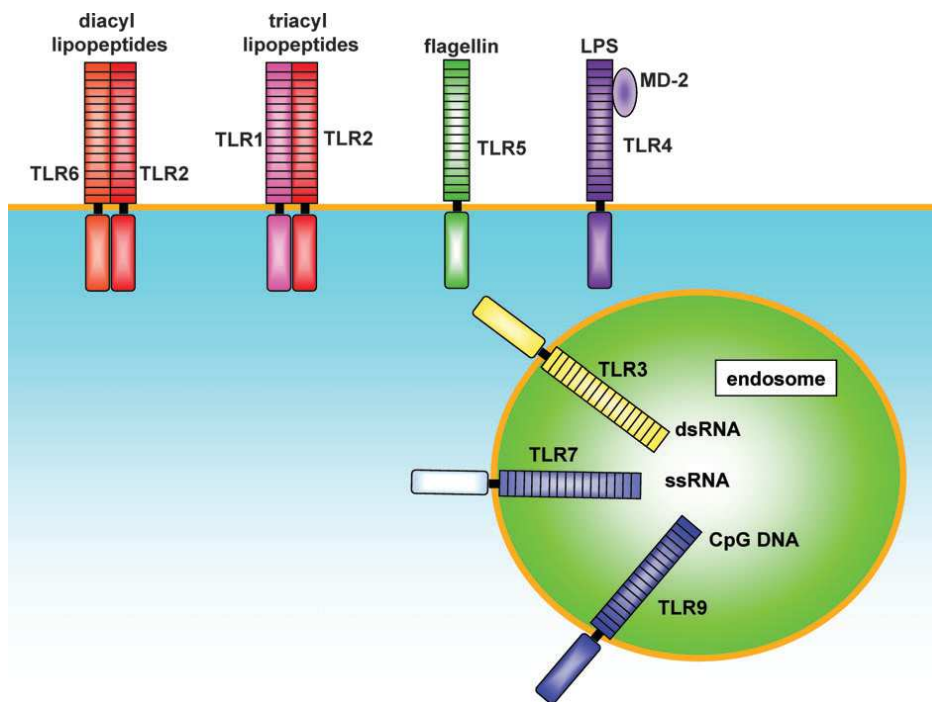
TLR3 je zodpovědný za rozpoznávání dvouřetězcové RNA, která je produkována mnoha viry při jejich replikaci (Alexopoulou a kol., 2001).

TLR4 je základním receptorem pro rozeznání lipopolysacharidu (LPS) z Gram-negativních bakterií. A jako jediný TLR receptor využívá všechny molekuly receptorové domény a je tedy schopen aktivovat oba typy signálních drah zprostředkovaných TLR (Hoshino a kol., 1999). LPS se neváže přímo na TLR4, ale na koreceptor CD14, který zprostředkovává jeho interakci. Další molekulou důležitou pro interakci s LPS je molekula MD-2. Ta je spojena s extracelulární doménou TLR4 na povrchu buňky (Akashi a kol., 2000).

TLR5 rozpoznává flagelin, což je protein obsažený v bakteriálních bičících jak Gram-pozitivních, tak i Gram-negativních bakterií (Hayashi a kol., 2001).

TLR7 rozeznává na guanosin a uridin bohaté jednořetězcové RNA viry, jako je např. HIV, VSV a virus chřipky (Diebold a kol., 2004). Některé flaviviry jsou též rozpoznávány tímto receptorem např. virus západonilské horečky (Town a kol., 2009) nebo Langat virus (Baker a kol., 2012). TLR7 rozpoznává také syntetické ligandy to deriváty skupiny imidazoquinolinů, jako jsou imiquimod či resiquimod (R 848) (Dockrell a kol., 2001).

TLR9 hraje důležitou roli v buněčném rozpoznávání bakteriální CpG DNA pocházející z bakterií (Hemmi a kol., 2000)



Obr.1. 3 Lokalizace Toll-like receptorů na povrchu buňky a na endoplazmatické membráně (Takeda a kol., 2005).

#### 1. 4. 1 Signální dráhy aktivované přes Toll-like receptory

Po stimulaci TLR dochází k jeho dimerizaci. U většiny TLR se tvoří homodimery. Jen TLR2 se formuje v heterodimer s TLR1 či TLR6, jak bylo zmíněno dříve.

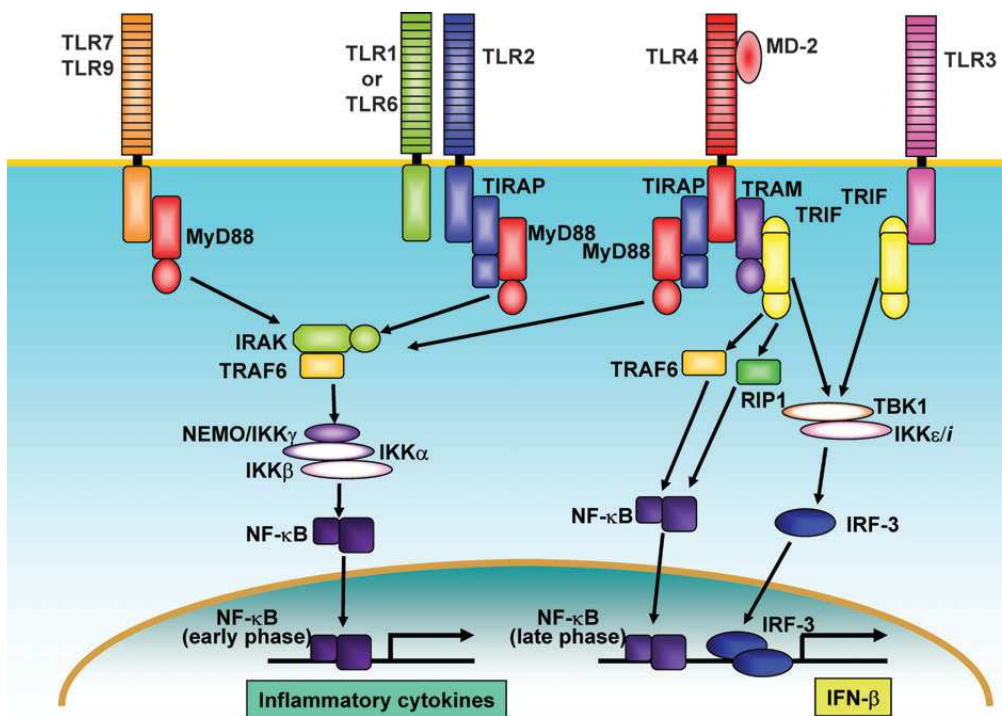
Dimerizací TLR se aktivují signální dráhy, které vychází z cytoplazmatické domény TIR. Na tuto doménu se vážou adaptorové molekuly jako MyD88, TIRAP, TRIF a TRAM, jež se vyskytují u různých TLR a aktivují rozdílné signální dráhy.

Molekula MyD88 je přítomna u všech TLR kromě TLR3. Aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B a MAP kinázy, což vede k indukci prozánětlivých cytokinů (Aderem a kol., 2000).

TRIF je u TLR3, TLR4 a podílí se na alternativní dráze vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru IRF3 a NF- $\kappa$ B. Výsledkem je indukce interferonu typu I a prozánětlivých cytokinů.

TRAM a TIRAP jsou molekuly, které zprostředkovávají interakci TRIF s TLR4 a MyD88 s TLR2 a TLR4 (Obr. 1. 4) (Takeda a kol., 2005)

Na základě těchto molekul spadajících pod TIR doménu lze signální dráhy zprostředkované TLR rozdělit na signalizaci závislou na MyD88, která řídí indukci prozánětlivých cytokinů a na signální dráhy závislé na TRIF, které jsou zase odpovědné, jak za indukci IFN typu I tak i prozánětlivých cytokinů (Akira a kol., 2006).



Obr. 1. 4 TLR signalizace (Takeda a kol., 2005)

TLR signalizace vychází z cytoplazmatické domény TIR, s kterou je spojen adaptor MyD88. Po navázání ligandu na TLR receptor se spouští kaskáda aktivací kináz rodiny IRAK, TRAF6 a IKK. Ten poslední komplex fosforyluje I $\kappa$ B protein a výsledkem je aktivace a translokace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra, kde indukuje expresi prozánětlivých cytokinů. Druhý adaptor TIRAP je součástí signální dráhy závislé na MyD88 a to u receptoru TLR2 a TLR4. Třetí adaptor TRIF je součástí drah nezávislých na MyD88. Čtvrtý adaptor TRAM je specifický pro dráhu zprostředkovanou skrze TLR4, jenž spouští oba tyto signálních drah. (Takeda a kol., 2005).

TLR se podílí i na antivirové imunitě. A to konkrétně TLR 3, TLR 7, TLR 8 a TLR9, jenž jsou schopné rozeznat některé virové nukleové kyseliny. Všechny tyto receptory rozeznávají degradované virové částice v endozomech či lyzozomech buňky.

Důsledkem aktivace TLR virovou infekcí jsou spuštěny mechanismy, které spustí expresi prozánětlivých cytokinů, aktivaci antigen prezentujících buněk jako jsou dendritické buňky a makrofágy, aktivaci NK buněk a indukci adaptivní imunity.

Aktivované TLR u DC spouští kaskádu dějů, které se podílí na zrání DC. Tato maturace je spojena, jak již bylo zmíněno dříve, se zvýšenou tvorbou MHC II komplexu a upregulací kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu dendritických buněk. Maturované DC migrují z místa infekce do sekundárních lymfatických orgánů, kde prezentují antigen (Bowie a kol., 2005). Klíčová role při aktivaci dendritických buněk náleží adaptoru MyD88.

Bylo ukázáno, že MyD88 deficitní myši, které byly vystaveny viru HSV-2, nebyly schopné produkovat CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, což demonstruje závislost aktivace T-lymfocytů na maturaci dendritických buněk (Kaisho a kol., 2001).

TLR jsou exprimovány na různých buňkách imunitního systému v různém množství, např. na monocytech se vytváří několik tisíc molekul na buňku a na nezralých dendritických buňkách je to jen několik stovek molekul. TLR jsou tvořeny i na jiných buňkách než imunitních a to na epitelálních buňkách trávicího, urogenitálního a dýchacího traktu cévních endotelálních buňkách, na srdečních myocytech a také adipocytech (Akira a kol., 2001).

## 1. 5 Interferon regulační faktory (IRF)

Pro přirozenou imunitu je důležitá indukce IFN typu I. K interferonům typu I se řadí IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\delta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\tau$  a IFN $\omega$  (Pestka a kol., 2004). IFN $\alpha/\beta$  je sekretován infikovanými buňkami a tyto interferony budou v následujících částech myšleny jako interferon typu I. Tato indukce je zprostředkována skrze receptory, které rozpoznávají patogeny, jako jsou viry, bakterie atd. Velmi zásadní roli v indukci IFN typu I hrají transkripční faktory patřící do rodiny interferon regulačních faktorů (IRF) (Honda a kol., 2006).

Je známo 9 členů této rodiny IRF1 – IRF9.

IRF jsou také důležité regulátory TLR signálních drah (Ozato a kol., 2007).

Každý IRF transkripční faktor se podílí na nějakém ději souvisejícím s imunitní reakcí a s růstem a diferenciací buněk. Dále jsou uvedeny stručně některé funkce jednotlivých IRF.

IRF1 stimuluje expresi interferonem stimulovaných genů a prozánětlivých cytokinů a podporuje Th1 odpověď (Honda a kol., 2006) a také působí jako supresor tumorů (Harada a kol., 1993).

IRF2 potlačuje expresi interferonem stimulovaných genů a podporuje buněčný a nádorový růst (Harada a kol., 1993).

IRF3 aktivuje genovou expresi interferonu a dále stimuluje interferonem stimulované geny (Honda a kol., 2006)

IRF4 stimuluje geny specifické pro B-lymfocyty a inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů (Sciammas a kol., 2006). Je důležitý při diferenciaci DC, T a B lymfocytů (Mittrucker a kol., 1997).

IRF5 stimuluje expresi myších prozánětlivých cytokinů (Honda a kol., 2006).

IRF6 je zodpovědný za vývoj buněk kůže (Richardson a kol., 2006).

IRF7 aktivuje genovou transkripci interferonu typu I v DC a ostatních buňkách (Honda a kol., 2006).

IRF8 rovněž aktivuje genovou expresi pro interferon typu I a prozánětlivých cytokinů v makrofágách a DC (Dror a kol., 2007).

IRF9 vytváří komplex se STAT1 a STAT2 a aktivuje transkripci interferonem stimulovaných genů (Darnell a kol., 1998).

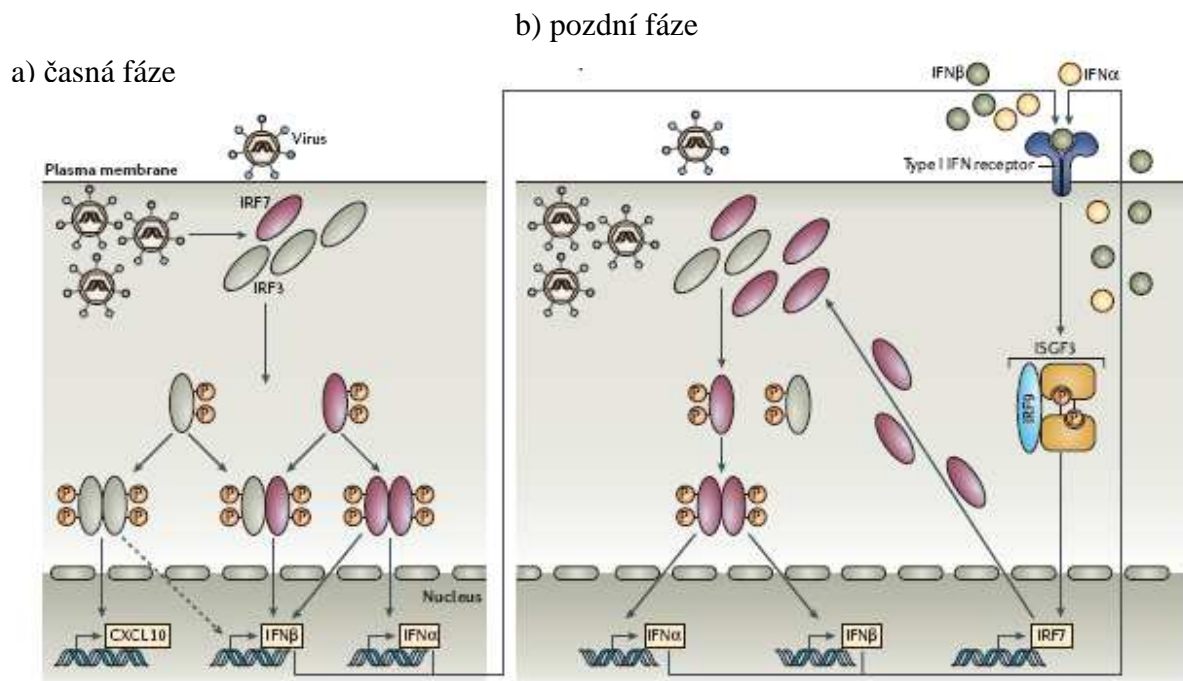
Každý IRF faktor obsahuje cca 120ti aminokyselinovou doménu rozpoznávající DNA sekvenci, která je označována jako interferonem stimulované elementy (ISRE). ISRE slouží jako promotor pro geny, jenž jsou indukovány signálními drahami spojenými s interferony typu I, konkrétně s IFN $\alpha/\beta$  (Taniguchi a kol., 2001). Tyto ISRE elementy jsou promotorem i pro geny, které kódují samotné interferony typu I a stejně tak geny zahrnuté v imunitních reakcích. Jak už bylo zmíněno výše, TLR receptory spouští signalizaci tří drah a to NF- $\kappa$ B dráhu, MAPK dráhu a IRF dráhu.

Interferon regulační faktory, které hrají pilotní roli v počáteční indukci interferonu typu I, jak po virové infekci či LPS stimulaci jsou IRF3 a IRF7.

IRF7 je stejně jako IRF3 volně v cytosolu buňky. Po rozpoznání virových částic nebo ligandu pro TLR4 receptor jsou aktivovány serin/threoninové kinázy TBK1 a IKK1, které fosforylují a tím i aktivují IRF3 a IRF7. Následně dojde k jejich dimerizaci a translokaci do jádra, kde stimulují transkripci IFN $\alpha/\beta$  (Sharma a kol., 2003). Je zajímavé, že TLR4 je aktivován kromě LPS i některými virovými částmi jako je např. fúzní protein F viru RS (Kurt-Jones a kol., 2000). IRF7 může vytvářet homodimer nebo heterodimer s IRF3 a tyto dimery mají také rozdílný vliv na expresi genů pro interferon typu I (Marie a kol., 1998). IRF3 je silný aktivátor IFN $\beta$  genů. Naopak, IRF7 účinně aktivuje, jak geny pro IFN $\beta$  tak i pro IFN $\alpha$  (Sato a kol., 2000). Výsledkem signalizace je indukce genů pro IFN $\beta$  nikoli pro IFN $\alpha$  (Hoshino, a kol., 2002).

Autokrinně produkováný interferon typu I, pak aktivuje Jak/Stat signální dráhu, jejímž výsledkem je kromě jiného i silná indukce IRF7. IRF7 pak pozitivně ovlivňuje druhou vlnu IFN exprese (Obr. 1. 5b). IRF3 je, na rozdíl od IRF7, exprimován v buňkách konstitutivně.





Obr. 1. 5 IRF faktory pozitivně regulují interferonové geny (Honda a kol., 2006).

a) časná fáze infekce, kdy IRF3/7 indukují expresi chemokinů a malé množství IFN $\alpha$ / $\beta$

b) pozdní fáze, kdy sekretované IFN $\alpha$  / $\beta$  aktivují Jak/Stat signální dráhu a následně indukují IRF7, což vede k robustní indukci interferonu.

Je známo, že čtyři interferon regulační faktory jsou pozitivní regulátoři transkripce genů pro interferon typu I a jsou to IRF1, IRF 5, IRF3 a IRF7. Při virové infekci jsou klíčovými regulátory genové exprese interferonu typu I právě IRF3 A IRF7, narozdíl od IRF1 a IRF5 (Taniguchi a kol., 2001).

## 2. Cíle práce

1. Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy a produkci prozánětlivých cytokinů *in vivo*.

2. Vliv klíštěcích cystatinů na genovou expresi interferon regulačních faktorů v dendritických buňkách po stimulaci TLR ligandy.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Buněčná linie, virus a klíštěcí cystatiny

**PS** – buněčná linie derivována z buněk prasečí ledviny. Buňky byly kultivovány v médiu L-15 (Leibovitz) s 3% prekolostrálním telecím sérem (PTS) (PAA), 1% antibiotiky a antimykotiky (ATB) (PAA), 1% glutaminem (PAA) při 37°C.

Pasážování bylo prováděno suchou trypsinizací.

Virus klíšťové encefalitidy kmen Neudoerfl. Virus byl 4x pomnožen na mozcích sajících myšek. Virus ve formě 20% mozkové suspenze dosahoval titru  $10^7$  PFU/ml.

Klíštěcí cystatiny byly laskavě poskytnuty Dr. Kotsyfakisem. Byly připraveny v *E. coli* a přečištěny od LPS (Kotsyfakis a kol., 2006).

#### 3. 2 Odběr klíštěcích slin

Klíšťata *Ixodes ricinus* sála na morčeti po dobu 6ti dní. Nasáté samice klíšťat byly připevněny pomocí oboustranné lepící pásky k podložním sklíčkům. Na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena skleněná kapilára, která se zařixovala pomocí modelíny. Na hřbetní část těla jim bylo aplikováno po 2 $\mu$ l 5% roztok pilokarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) v 95% ethanolu. Takto připravená klíšťata se umístila do vlhké komůrky, kde byla inkubována po dobu 2 hodin při 37°C; 3,5 % CO<sub>2</sub>. Za daný čas klíšťata vyprodukovala sliny v objemu 2–10 $\mu$ l.

Obsah proteinů ve slinách byl stanoven pomocí metody podle Bradfordové pro stanovení koncentrace proteinů (souprava BioRad, Bradford, 1976). Odběr slin byl prováděn metodou podle Valenzuela a kol., (2000). Sliny byly uchovány při teplotě -70°C.

Klíšťata pro odběr slin pocházela z volné přírody z oblasti Českých Budějovic. Byla odchytávána metodou vlajkování. Před pokusy byly sliny filtrovány, čímž bylo zabráněno přítomnosti spirochét Lymské boreliózy.

### 3. 3 Plaková titrace

Pro vyjádření titrů v plakotvorných jednotkách (PFU, angl. Plaque forming units) byla použita metoda plakové titrace (de Madrid a Porterfield, 1969). Byly použity 24-amkové panely (TPP, Švýcarsko), do nichž byly naředěny testované vzorky desítkovým ředěním v kultivačním médiu. V každé jamce bylo 200 $\mu$ l ředěného vzorku. Titrovalo se na PS buňkách. Do každé jamky bylo přidáno 300 $\mu$ l suspenze PS buněk v množství 1,2 x 10<sup>5</sup> buněk na jamku (koncentrace 4 x 10<sup>5</sup> buněk/ml). Obsah panelu byl promíchán. Po uplynutí 4–5 hodin byl přidán přeliv po 400 $\mu$ l na jamku. Přeliv byl roztok 3% karboxymethylcelulózy (CMC) a 2x koncentrovaného L-15 kultivačního média v poměru 1:1. Vše bylo inkubováno při 37°C v atmosféře 0,5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí přibližně 6ti dnů inkubace byly panely promyty fyziologickým roztokem (0,9% roztok NaCl) a poté obarveny roztokem naftalenové černě (1g naftalenové černě, 60ml ledové kyseliny octové; 13,5g octanu sodného a doplněno do 1 l H<sub>2</sub>O). Na základě toho bylo možné stanovit počet vytvořených plaků.

### 3. 4 Infekce myší virem klíšťové encefalidity

Myši (šestitýdenní samice) kmenu C57BL/6 (Charles River Laboratories) byly subkutánně infikovány dávkou 200 PFU/ml viru klíšťové encefalidity kmenu Neudoerfl v 200 $\mu$ l média L15 s 3% PTS tzn. jedna myš infikována dávkou 200 PFU/ml v objemu 200 $\mu$ l. Myši byly rozděleny do tří skupin. První skupina byla kontrolní. Tyto myši byly infikovány jen virem. Druhá skupina myší byla infikována virem se slinami z klíšťe *Ixodes ricinus* o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml v objemu 200 $\mu$ l média L15 s 3%. Třetí skupina myší byla infikována virem a byly na ně nasazeny buď nymfy klíšťe *Ixodes ricinus* (10 nymf na jednu myš) a v dalším experimentu dospělci klíšťe *Ixodes ricinus* (2 dospělci na jednu myš). V daných časových intervalech 1, 2, 3, 4, 5 a 6 dní byl stanovován titr viru v séru, slezině a kůži (v místě sání nymf či klíšťat). Pro každý interval byly odebírány zmíněné orgány ze 3 jedinců z každé skupiny. Orgány byly homogenizovány v homogenizátoru (Tissue Lyser II, Roche) při 30 000Hz po dobu 3 až 6 minut za vytvoření 20% suspenze (w/v) v médiu L15 s 3% PTS a 1% ATB. Vzniklá suspenze ze slezin a kůží byla poté centrifugována 10 minut při 12 000 rpm (4°C, úhlový rotor Hettich 1615).

Titř viru ve vzniklém supernatantu byl zjištěn plakovou titrací. Krev byla také centrifugována při 10 minut při 12 000 rpm (4°C, úhlový rotor Hettich 1615). Vzniklé sérum bylo taktéž podrobena plakové titraci.

### **3. 5 Stanovení koncentrace TNF $\alpha$ a IFN $\gamma$ v séru**

Koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IFN $\gamma$  byla stanovována ve vzorcích séra ze všech odebíraných intervalů a skupin. Pro jejich stanovení byl použit ELISA Kit (e-Bioscience). Postupovalo se podle návodu výrobce.

### **3. 6 Izolace dendritických buněk**

Dendritické buňky byly izolovány metodou pozitivní selekce na marker CD11c s využitím magnetických kuliček. Myši byly usmrceny cervikální translokací a následně jim byla vyjmuta slezina. Ta byla rozstřihána na malé kousíčky a inkubována v médiu RPMI (PAA) s liberázou DL (Roche) o koncentraci 0,67 U/ml a DNázou o koncentraci 200 $\mu$ g/ml (Roche) po dobu 30 minut při 37°C na třepačce. Poté byly protlačeny skřze 70 $\mu$ m sítko (BD Biosciences) a přiředěny dvojnásobným objemem MACS pufru (PBS (fosfáty pufrovaný fyziologický roztok)) s 1mM EDTA a 2% BOFES (bovinní fetální sérum)) a centrifugovány 10 minut při 1 500 rpm (4°C, úhlový rotor Hettich 1620). Po centrifugaci byl buňkový pelet resuspendován v 830 $\mu$ l MACS pufru a bylo přidáno 50 $\mu$ l CD11c kuliček (anti-CD11c (N418)Ab, Miltenyi Biotec) a následovala inkubace 15 minut na ledu. Po inkubaci byl přidán 10ti násobný objem MACS pufru a směs centrifugována 10 minut 1 500 rpm (4°C, úhlový rotor Hettich 1620). Pelet byl resuspendován v 1000 $\mu$ l MACS pufru. Následovala separace na MACS kolonce dle instrukcí výrobce (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Takto získané dendritické buňky byly kultivovány v médiu RPMI doplněn o 10% fetální sérum (BOFES), 1% ATB (antibiotika a antimykotika) a 50  $\mu$ M ME (merkaptioetanol) (Sigma).

### **3. 7 Aktivace dendritických buněk TLR ligandy**

Čerstvě vyizolované dendritické buňky byly založeny do 24 jamkovém panelu (TPP, Švýcarsko) o koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk na jamku v objemu 1ml. Druhý den byly buňky stimulovány LPS (100ng/ml) (Sigma) nebo Poly (I:C) (Ivitrogene) s imiquimodem (R 837) (Invivogene) (oba o koncentraci 5 $\mu$ g/ml) po dobu 4 nebo 10 hodin. Stimulaci buněk předcházela preinkubace s cystatiny SialoL a SialoL2 (4 $\mu$ M) 2 hodiny. Poté byla z dendritických buněk vyizolována RNA.

### **3. 8 Izolace RNA a syntéza komplementární DNA (cDNA)**

Totální RNA z dendritických buněk byla extrahována za použití Nucleospin RNA II kitu (Macherey-Nagel) a postupovalo se přesně podle instrukcí výrobce. Kvalita vyizolované RNA byla zkontrolována na 1% agarózovém gelu. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky (Biophotometer, Eppendorf).

1 $\mu$ g totální RNA byl použit k syntéze komplementární DNA (cDNA).

Pro syntézu cDNA byl použit cDNA kit (Applied Biosystems). Postupovalo se podle instrukcí výrobce.

Rozpis reakce pro 1 vzorek byl následující:

10 $\mu$ l 2x RT pufr (Applied Biosystems)

1 $\mu$ l RT (Reverzní transkriptáza, Applied Biosystems)

1 $\mu$ g totální RNA v 9 $\mu$ l (RNA-free voda)

Vzorky byly inkubovány 60 minut při 37°C a 5 min při 95°C. Vytvořená cDNA byla pak použita v kvantitativní real-time PCR.

### **3.9 Kvantitativní real-time PCR**

Real-time PCR byla amplifikována v 0,1 ml PCR stripech (Qiagen) v přístroji Rotor Gene 3000 (Corbett Research), jenž používá software Rotor-Gene verze 6.0.19 (Corbett Research).

Primery a sondy (Sigma) specifické pro myši IRF4 a IRF7 jsou uvedené v Tab. 3.1 a Tab. 3.2. Sondy byly duálně značeny na 5' konci fluorochromem FAM a na 3' konci zhášečem BHQ1.

Tab. 3.1.

<b>Sekvence</b>	<b>IRF 4</b>
sonda	5'-CATAATCCCTCCAGCTCCTGTCAT-3'
forward primer	5'-CCAGCAGGTTTCATAACTA-3'
reverse primer	5'-GGACATTGATATGGGATTTC-3'

Tab. 3.2.

<b>Sekvence</b>	<b>IRF 7</b>
sonda	5'-ACCACAAGTTCTCAAACCTCATCTG-3'
forward primer	5'-CACTGAGTTCTGAACCTA-3'
reverse primer	5'-GTTGGTAACAGGTAGGAA-3'

Reakční směs na jeden vzorek obsahovala (výsledná koncentrace je uvedena v závorce):

10µl 2x JumpStart *Taq* Ready Mix (Sigma)  
 2,8µl 25mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma) (3,5mM)  
 0,4µl 20µM fluorescenční sonda (200nM)  
 1µl 10µM forward primer (500nM)  
 1µl 10µM reverse primer (500nM)  
 3,8µl deionizovaná voda

Do připravené směsi byl přidán 1µl cDNA. Celkový objem reakční směsi byl 20µl.

Amplifikace probíhala v cyklu Rotor Gene 3000 za následujících podmínek:

1x 2 minutová inkubace při 94°C  
 40x 94°C po dobu 15 sekund a 60°C po dobu 1 minuty

Real-time PCR byla prováděna v triplikátech. Data byla vyhodnocena programem Rotor-Gene 6.0.19. Získaná data byla analyzována komparativní C<sub>T</sub> metodou.

Jako referenční gen byl použit  $\beta$ -aktin (Applied Biosystem). Normalizované hodnoty  $C_T$  (proti  $\beta$ -aktinu) byly vztahovány proti kontrole, což byly nestimulované dendritické buňky.

Pro výpočet relativní exprese sledovaných genů byl použit tento vzorec (Livak a kol., 2001):

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T (\text{sledovaný gen}) - \Delta C_T (\text{kontrola}))}$$

### 3.10. Statistická analýza

Statistická významnost výsledků byla vyhodnocována v programu Medcalc 11.2.0.0. Byly použity statistické metody jednosměrná ANOVA pro data týkající se vlivu klíštěcích slin na replikaci VKE *in vivo* a Studentův t-test pro výsledky týkající se exprese genů IRF4 a IRF7. Výsledky, jejichž hladina významnosti je menší než  $p < 0,05$  jsou považovány za statisticky signifikantní. V grafech je zobrazena  $\pm$  směrodatná odchylka.

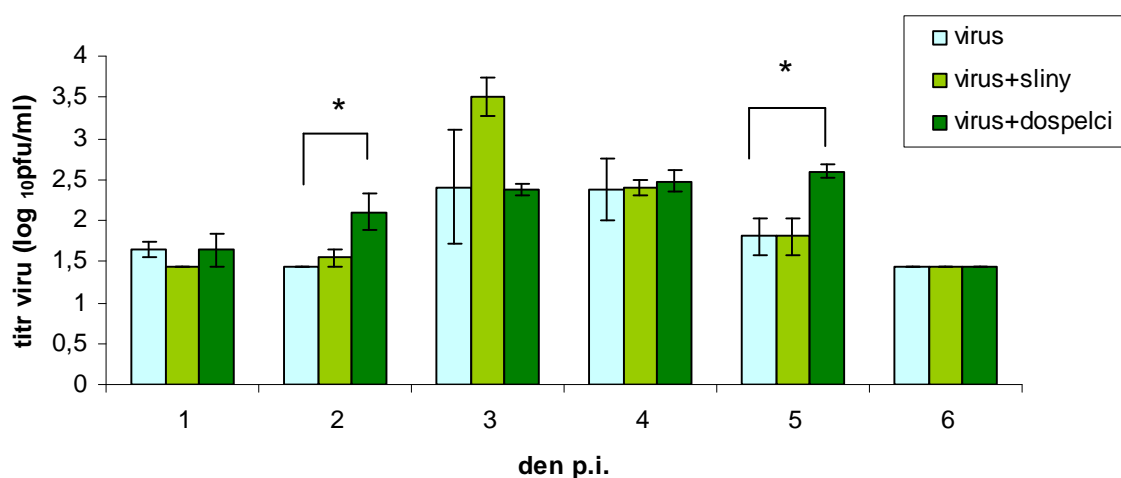


## 4. Výsledky

### 4. 1 Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy *in vivo*

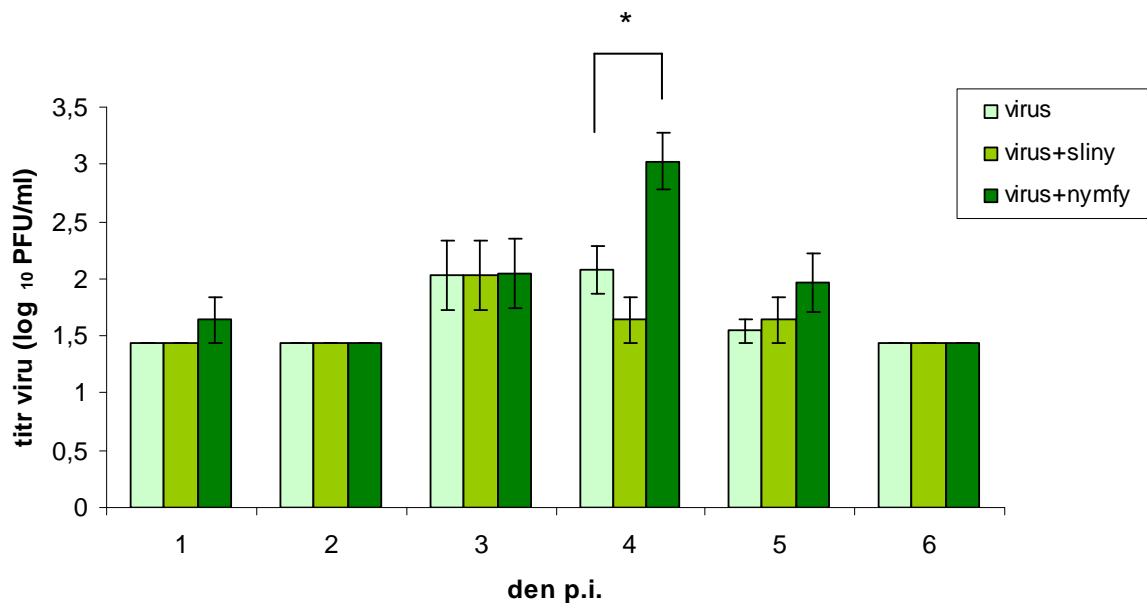
Myši C57BL/6 byly infikovány subkutánně virem klíšťové encefalitidy kmenem Neudoerfl o koncentraci 200 PFU/ml. Myši byly rozděleny do 3 skupin: virus (kontrolní skupina), virus+sliny a virus+nymfy/dospělci. Vzorky ze slezin a z kůží byly na přítomnost viru KE negativní. Jen ve vzorcích sér bylo možné stanovit titer viru KE, proto následující grafy zobrazují výsledky týkající se vzorků sér.

Vlivem sání dospělců *Ixodes ricinus* byl pozorován signifikantně zvýšený titer viru již 2. den p.i. a to z  $1,44 \log$  PFU/ml na  $2,1 \pm 0,2265 \log$  PFU/ml a 5. den p.i. z  $1,8 \pm 0,2265 \log$  PFU/ml na  $2,59 \pm 0,07395 \log$  PFU/ml vlivem sání dospělců oproti kontrolní skupině infikované samotným virem (Obr. 4.1).



Obr. 4.1 Vliv slin na titer viru KE v séru myši. Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200 PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci  $20 \mu\text{g}$  proteinů/ml.  
\*... $p < 0,05$

V případě nymf se ukázalo, že replikace viru byla 4. den p.i. zvýšena z  $2,09 \pm 0,2024 \log$  PFU/ml na  $3,03 \pm 0,2467 \log$  PFU/ml a mírně i 5. den p.i. (Obr. 4.2).



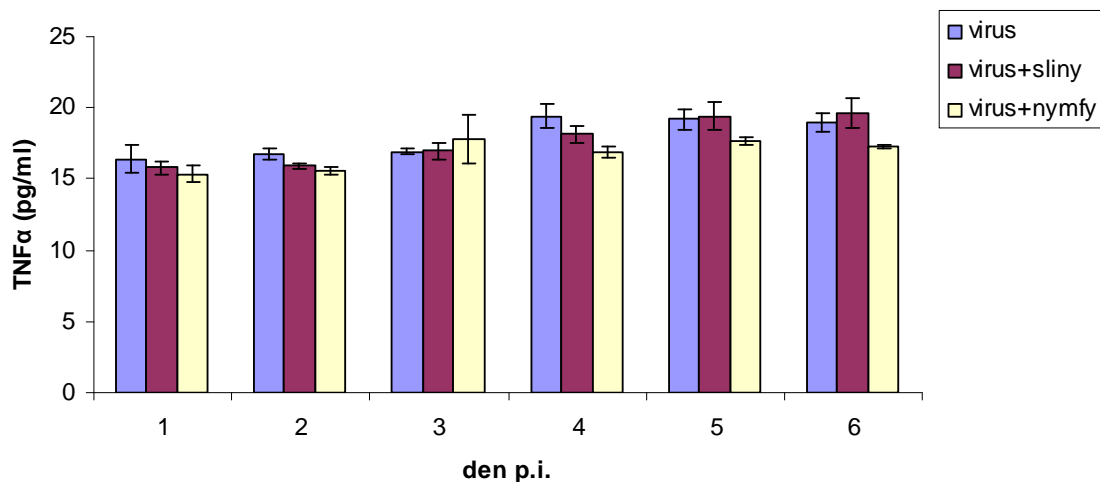
Obr. 4.2 Vliv slin na titer viru KE v séru z myší. Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200 PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml.  
\*...p < 0,05

#### 4.2 Vliv klíčtčích slin na koncentrace TNF $\alpha$ a IFN $\gamma$ v séru

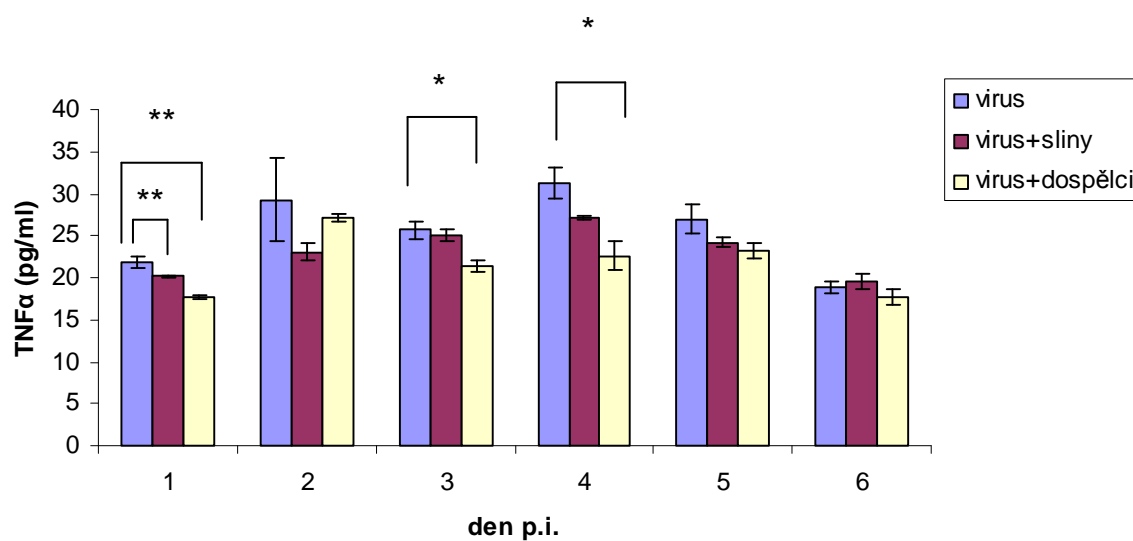
Ve vzorcích séra byla pak stanovována koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF  $\alpha$  a IFN $\gamma$ . Koncentrace TNF $\alpha$  v přítomnosti sání nymf měla klesající trend, ale pokles nebyl signifikantní (Obr. 4. 3). V případě sání dospělců bylo pozorováno výrazné signifikantní snížení koncentrace TNF $\alpha$  již 1. den p. i. a to z 21,81 $\pm$ 0,6061 pg/ml na 17,68 $\pm$ 0,2672 pg/ml vlivem sání.

K dalšímu signifikantnímu snížení TNF $\alpha$  došlo 3 den p. i. z 25,65 $\pm$ 1,069 pg/ml na 21,31  $\pm$  0,7284 pg/ml a 4. den p. i. z 31,21 $\pm$ 1,8433 pg/ml na 22,62 $\pm$ 1,6536 pg/ml (Obr. 4.4).

Byla měřena i koncentrace IFN $\gamma$  ve vzorcích séra. V případě sání nymf koncentrace IFN $\gamma$  nebyla v séru ovlivněna (Obr. 4. 5). Sání dospělců koncentraci IFN  $\gamma$  ovlivnilo až 6. den p.i., ale tento výsledek nebyl statisticky významný. Jinak lze pozorovat klesající trend koncentrace IFN $\gamma$  ve skupině virus a sliny (Obr. 4. 6).

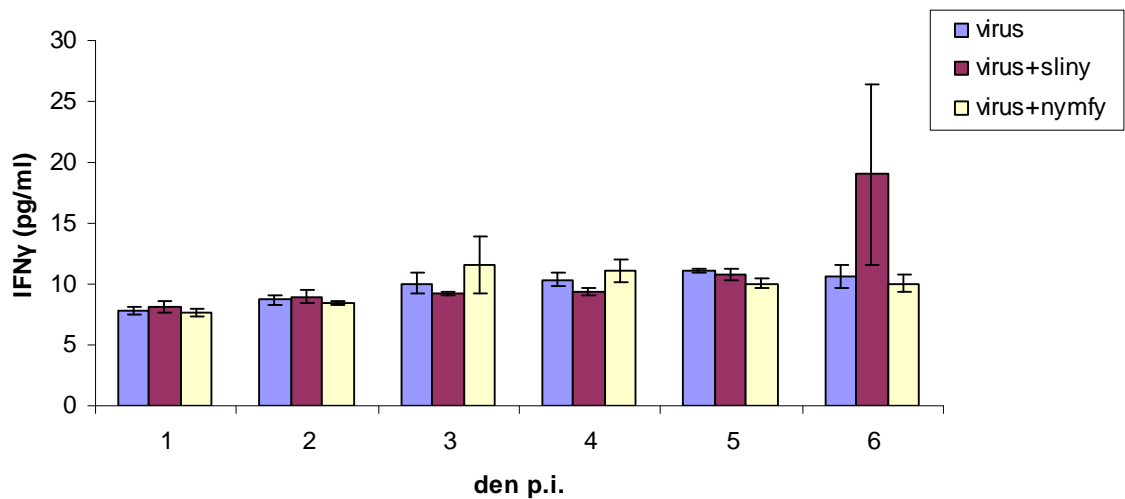


Obr. 4. 4 Vliv slin na koncentraci TNF $\alpha$  v séru z myši. . Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml.

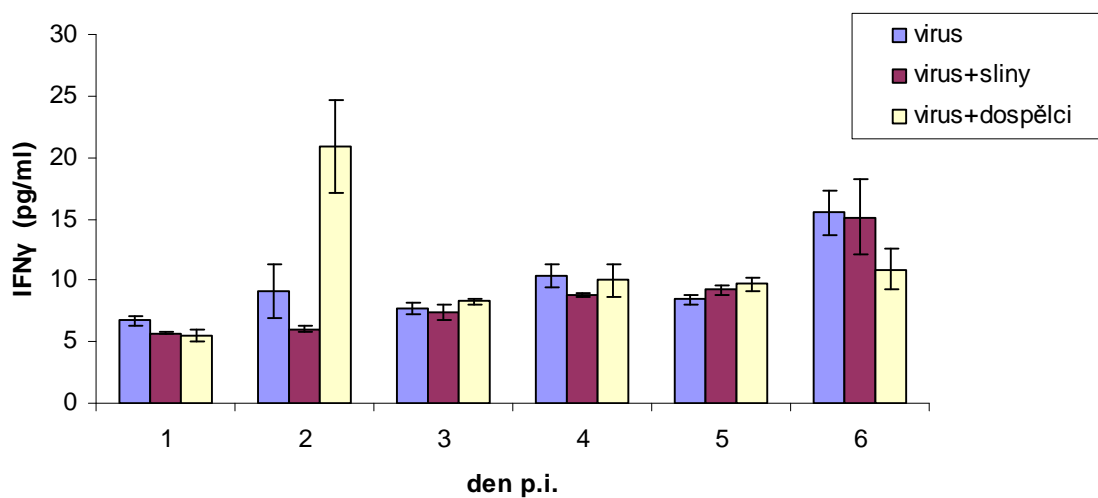


Obr. 4. 4 Vliv slin na koncentraci TNF $\alpha$  v séru z myši. . Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml.

\*...p < 0,05, \*\*... p < 0,001



Obr. 4. 5 Vliv slin na koncentraci IFN $\gamma$  v séru z myši. Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml.



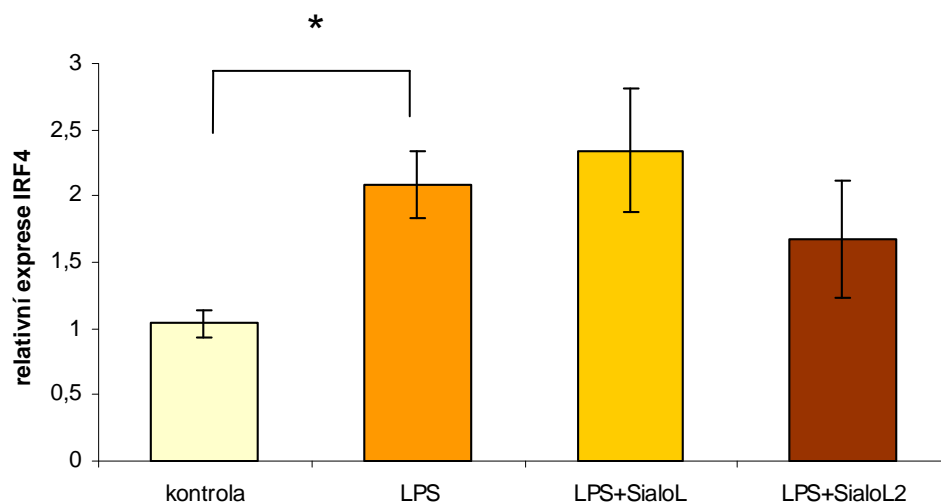
Obr. 4. 6 Vliv slin na koncentraci IFN $\gamma$  v séru z myši. Myši byly subkutánně infikovány VKE-Neudoerfl o koncentraci 200PFU/ml. Použité sliny byly o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml.

### 4.3 Účinek cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF4 a IRF7 v DC stimulovaných s LPS

IRF4 a IR 7 jsou jedny z transkripčních faktorů, které hrají důležitou roli jako regulátory TLR signalizace. IRF4 negativně reguluje TLR signalizaci a také působí jako negativní regulátor produkce prozánětlivých cytokinů (Honma a kol., 2005). IRF7 je zase důležitý pro indukci interferonových genů.

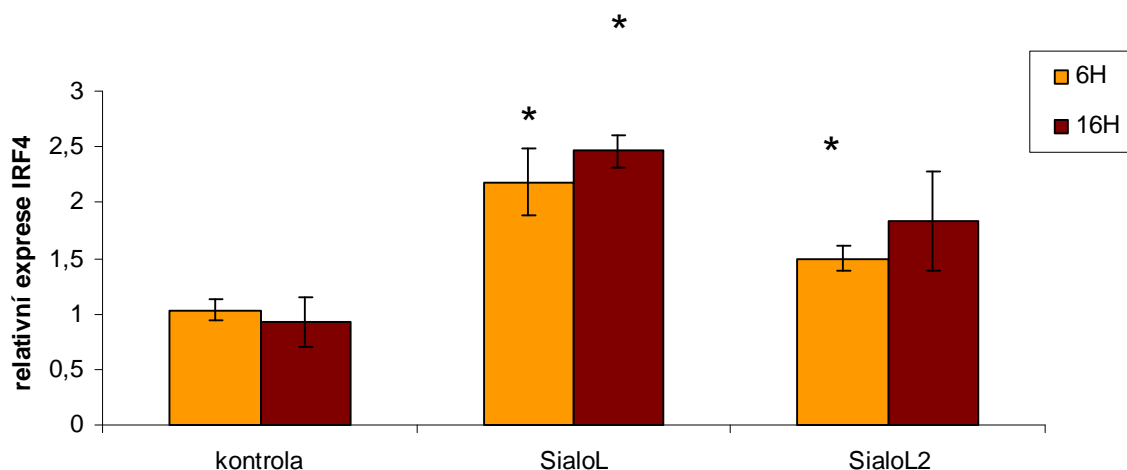
Jak již bylo zmíněno na začátku této práce SialoL inhibuje LPS indukovanou maturaci DC (Sa-Nunes a kol., 2009). V následujícím experimentu jsme testovali zda cystatiny neovlivňují LPS závislou indukci TLR4.

Dendritické buňky byly stimulovány ligandem LPS pro TLR4. Aktivací tohoto receptoru se spouští dráhy, jejichž výsledkem může být aktivace námi sledovaných genů pro IRF4 a IRF7. Po stimulaci DC byla exprese genu pro IRF4 dvojnásobně zvýšena oproti nestimulovaným buňkám (Obr. 4.7). Cystatiny na LPS vyvolanou indukci IRF4 žádný vliv neměly.



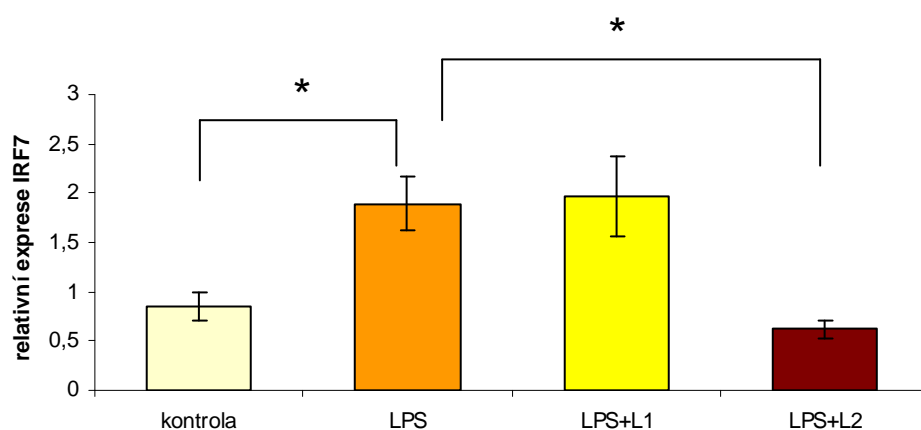
Obr. 4. 7. Účinek SialoL a SialoL2 na genovou expresi IR4 v DC stimulovaných LPS.

Avšak oba cystatiny SialoL a SialoL2 měly za následek statisticky významně zvýšenou expresi genu IRF4 u DC bez stimulace LPS. Indukce IRF4 se SialoL byla výraznější a byla pozorována v obou časových intervalech (Obr. 4. 8).



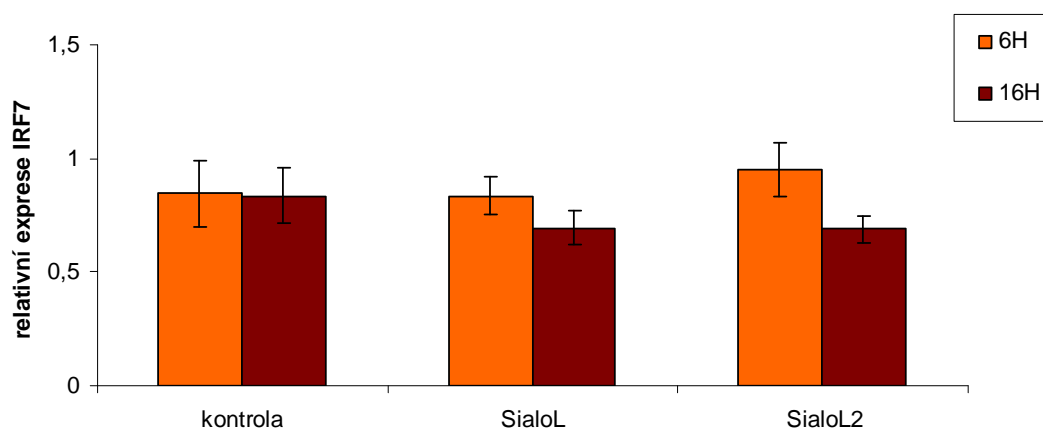
Obr. 4.8. Účinek SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF4 v DC.

Dále byl sledován vliv cystatinů na expresi genu IRF7 po stimulaci LPS. Účinkem LPS se exprese IRF7 2,3-násobně zvýšila oproti expresi tohoto genu v nestimulovaných buňkách. Přítomnost SialoL neměla na indukci IRF7 žádný vliv. Naopak přítomnost SialoL2 zcela zainhibovala LPS vyvolanou indukci (Obr. 4. 9). Tento inhibiční efekt byl pozorován ve třech nezávislých experimentech.



Obr. 4.9 Účinek SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF7 v DC stimulovaných LPS-

I v tomto případě jsme se podívali, zda samotné cystatiny neovlivňují expresi IRF7, ale ukázalo se, že samotné na IRF7 vliv nemají (Obr. 4.10).

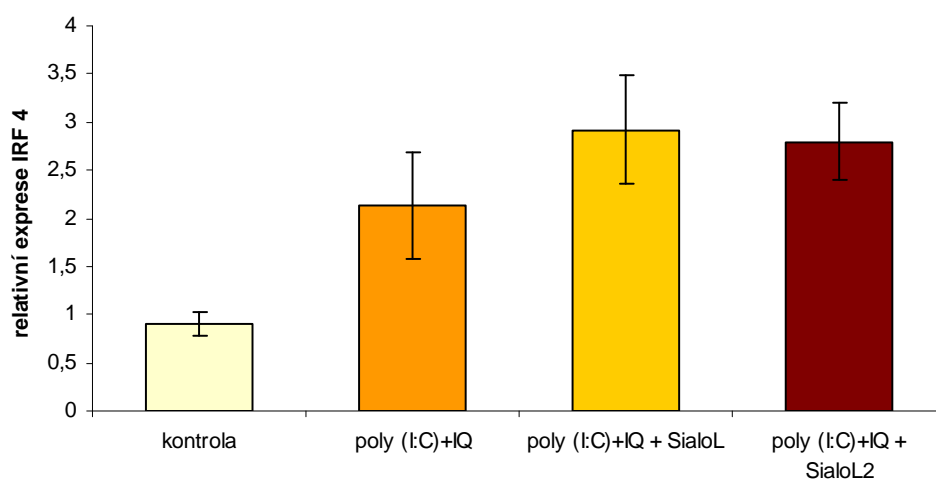


Obr. 4.10. Účinek SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF7 v DC.

#### 4. 4 Účinek cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi IRF4 a IRF7 v DC stimulovaných ligandy Poly (I:C) a Imiquimod (IQ)

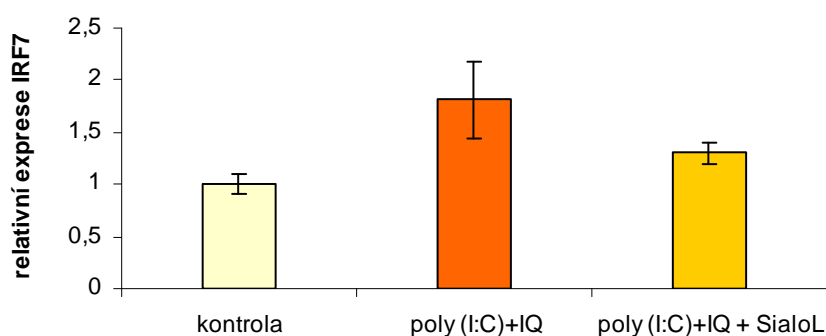
S cílem otestovat účinky cystatinů na indukci IRF4 a IRF7 i po stimulaci jinými TLR ligandy (relevantními k virové infekci) byl prováděn následující experiment. Ligand imiquimod (IQ) je znám jako farmakologický agonista pro TLR7. Ligand Poly (I:C) je agonista TLR3 receptoru. Buňky byly stimulovány kombinací těchto dvou ligandů po dobu šesti hodin.

Výsledky ukázaly, že DC po stimulaci imiquimodem a Poly (I:C) měly zvýšenou expresi genu IRF4. Vlivem cystatinů byla exprese IRF4 ještě o něco zvýšena, i když zvýšení nedosáhlo statistické významnosti (Obr. 4. 11).



Obr. 4. 11 Účinek SialoL a SialoL2 a na genovou expresi IRF4 v DC. Buňky stimulovány Poly (I:C) a imiquimodem (IQ) oba o koncentraci 5 $\mu$ g/ml po 6h.

V případě exprese genu IRF7 žádné výrazně zvýšení po šesti hodinách pozorováno nebylo. K indukci IRF7 došlo až po 16ti hodinách po stimulaci imiquimodem a Poly (I:C). Byl testován pouze vliv SialoL, v jehož přítomnosti byla pozorována mírná suprese, avšak rozdíl nebyl statisticky signifikantní (Obr. 4. 12).



Obr 4. 12 Účinek SialoL a na genovou expresi IRF7 v DC. Buňky stimulovány Poly (I:C) a imiquimodem (IQ) oba o koncentraci 5 $\mu$ g/ml po 16h.



## 5. Diskuse

V této práci jsme se pokusili demonstrovat, že sání nymf či dospělců klíštěte *Ixodes ricinus* má vliv na replikaci viru klíšťové encefalitidy *in vivo*. Ukázalo se, že titer viru KE byl v séru zvýšen vlivem sání jak dospělců, tak i nymf oproti kontrolní skupině myší. Sání klíšťat mělo nejvýraznější vliv na hladinu virémie 4. a 5. den po infekci. Vliv samotných slin na virémii byl poměrně malý a to pouze 3. den po infekci. Důvodem tohoto rozdílu může být skutečnost, že složení slin se v klíštěti po čas sání mění (McNally a kol., 2012). Námi používané sliny byly získány s klíšťat, která sála na morčeti 6 až 7 dnů. Takže složení slin se mohlo lišit. Kromě toho klíště během celého sání periodicky injikuje sliny do hostitele, takže imunitní systém kůže je dlouhodobě ovlivněn na rozdíl od jednorázové injekce klíštěcích slin.

*In vitro* experiment se slinami klíštěte *Ixodes ricinus* a VKE na dendritických buňkách, ukázal, že sliny modulují virem zprostředkované změny v DC, konkrétně zvyšují počet virem infikovaných buněk, snižují TNF $\alpha$  a IL-6 a snižují virem indukovanou apoptózu (Fialová a kol., 2010). Dále se v *in vitro* podmínkách ukázalo, že extrakt ze slinných žláz zvyšuje replikaci viru vesikulární stomatitidy (VSV) (Hajnická a kol., 1998). Z toho plyne, že sliny mají vliv na replikaci virů, a to i takových, které nepatří mezi arboviry. U viru západonilské horečky, který je také flavivirus a arbovirus jako VKE, se prokázal vliv na zvýšení jeho replikace *in vivo* v důsledku sání komárů, jimiž je tento virus přenášen (Styer a kol., 2011).

Sání klíšťat mělo vliv i na koncentraci cytokinů a to konkrétně na TNF $\alpha$  a IFN $\gamma$ , které patří mezi prozánětlivé cytokiny. Obecně virová infekce zvyšuje hladinu prozánětlivých cytokinů. V našich experimentech *in vivo* byl tento předpoklad potvrzen. Koncentrace TNF $\alpha$  byla virem zvýšena. Podobného zvýšení TNF $\alpha$  v séru bylo dosaženo u myší infikovaných kmenem Oshima viru KE (Hayasaka a kol., 2009). TNF $\alpha$  je produkován aktivovanými makrofágy a T-lymfocyty. Vlivem slin byla koncentrace TNF $\alpha$  v séru snížena. Lze předpokládat, že aktivita T-lymfocytů mohla být snížena. Stejného výsledku bylo dosaženo v experimentech, které probíhaly *in vitro* (Gwakisa a kol., 2001), (Ramachandra a kol., 1992), (Fialová a kol., 2010). Hladina IFN $\gamma$  byla v séru myší také mírně snížena vlivem sání klíšťat. Tento náš výsledek koreluje s *in vitro* experimenty, kde extrakt ze slinných žláz snižoval koncentraci IFN $\gamma$  myších splenocytů po stimulaci LPS (Kopecký a kol., 1999, Kovář a kol., 2002).

Je zřejmé, že sliny obsahují molekuly, které usnadňují replikaci viru v buňkách a jeho další šíření. Pravděpodobně je to dáno jejich imunomodulačními účinky. Zatím nebyly identifikovány žádné konkrétní molekuly zodpovědné za popisované efekty.

V další části této práce jsme se zabývali vlivem klíštěcích cystatinů SialoL a SialoL2 na expresi některých interferon regulačních faktorů v dendritických buňkách po stimulaci LPS a částečně ligandy imiquimodem a Poly (I:C), jež jsou farmakologickými analogy ssRNA a dsRNA virů.

Cystatiny jsou přirozené inhibitory cysteinových proteáz, mezi které mimo jiné patří i katepsiny. Různé katepsiny hrají velmi důležitou roli při prezentaci antigenu a maturaci MHC II komplexu (Hsing a kol., 2005) a také tkáňové angiogenesi (Obermajer a kol., 2008). Inhibicí lysosomálních proteáz u antigen prezentujících buněk vlastně dochází k utlumení dějů, které jsou zodpovědné za spouštění obranných mechanismů (Kotsyfakis a kol., 2010). Inhibiční účinek klíštěcího cystatinu sialoL na dendritické buňky byl již pozorován a dokumentován (Sa-Nunes a kol., 2009). DC stimulované LPS produkovaly méně prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IL-12 v přítomnosti SialoL a rovněž byla zaznamenána snížená exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86.

Dendritické buňky jsou spojnicí mezi přirozenou a adaptivní imunitou. A důležitou roli v nich hrají interferon regulační faktory, což jsou transkripční faktory, které ovlivňují funkce a maturaci dendritických buněk. Podílí se na regulaci signálních drah spouštěných TLR receptory (Gabriele a kol., 2007). My jsme testovali, zda k inhibičním účinkům SialoL a SialoL2 nedochází přes působení na genovou expresi interferon regulačních faktorů. V našich experimentech jsme se zaměřili na IRF4 a IRF7.

Buňky stimulované přes TLR4 receptor LPS signifikantně zvýšily expresi IRF4. Toto pozorování je v souladu s literaturou, že indukci IRF4 spouští několik TLR ligandů (Taylor a kol., 2006). *In vivo* experimentem se ukázalo, že IRF4 má funkci negativního regulátoru produkce prozánětlivých cytokinů jako je TNF $\alpha$  makrofágy (Honma a kol., 2005). IRF4 je tedy indukovatelný negativní regulátor TLR signalizace.

Naše experimenty ukázaly, že cystatiny nemají vliv na expresi IRF4 po LPS stimulaci (alespoň v testovaném časovém intervalu), ale výrazně ovlivnily jeho expresi bez LPS. IRF4 má schopnost se vázat na molekulu MyD88, která je součástí TLR signalizace. Na stejné vazebné místo na MyD88 se váže jiný faktor z rodiny IRF a to IRF5.

IRF5 indukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a interferonových genů. Je tedy pozitivním regulátorem TLR signalizace. IRF4 a IRF5 soutěží o stejné vazebné místo na Myd88 (Negishi a kol., 2005).

Oba klíčtější cystatiny signifikantně zvýšily expresi negativního regulátoru IRF4. Jedním z mechanismů, jakým cystatiny inhibují aktivaci dendritických buněk může být indukci IRF4. Tento náš výsledek by mohl teoreticky vysvětlit sníženou produkci cytokinů TNF $\alpha$  a IL-12 v dendritických buňkách vlivem SialoL (Sa-Nunes a kol., 2009). IRF4 by mohl sloužit i jako represor po navázání na interferonem stimulované elementy (ISRE) některých genů kódujících MHC I molekuly (Yamagata a kol., 1996).

Účinky cystatinů na indukci IRF4 byly testovány i po stimulaci jinými TLR ligandy, které byly relevantní k virové infekci. Ligand imiquimod je znám jako farmakologický agonista pro TLR7. Tento ligand stimuluje strukturu ssRNA virů, které jsou TLR7 receptorem rozpoznávány. Ligand Poly (I:C) je agonista TLR3 receptoru, jenž aktivuje signální dráhu, která aktivuje IRF3 faktor, který je úzce spjat i s IRF7 faktorem. Jeho struktura je podobná dsRNA virům, které jsou rozpoznávány právě TLR3 receptorem (Kawai a kol., 2010). V DC po stimulaci imiquimodem a Poly (I:C) byla pozorována zvýšená expresi genu IRF4. Cystatiny měly trend zvyšovat expresi IRF4, i když zvýšení nedosáhlo statistické významnosti. Výsledek byl tedy obdobný jako s LPS ligandem.

Dalším námi sledovaným faktorem byl IRF7, který je spojován s indukcí interferonu typu I (IFN $\beta/\alpha$ ) a přirozenými obrannými mechanismy proti virům. Jak ukázal pokus *in vivo* s deficitními myšmi na IRF7 gen, byly myši citlivější k virové infekci a byla prokázána i nízká hladina interferonu v jejich séru, což ukazuje nato, že IRF7 je klíčovým faktorem v indukcí interferonové antivirové odpovědi (Honda a kol., 2005).

Naše výsledky ukazují, že exprese IRF7 po stimulaci TLR4 pomocí LPS byla zvýšena.

Indukce IRF7 po TLR4 aktivaci je zprostředkována autokrinně produkovaným interferonem typu I, který pak aktivuje Jak/Stat signální dráhu, jejíž výsledkem je kromě jiného i indukce IRF7. IRF7 pak pozitivně ovlivňuje druhou vlnu interferonové exprese.

Indukce IRF7 po LPS stimulaci byla zcela zainhibována v přítomnosti SialoL2, na rozdíl od SialoL. Indukce IRF7 po LPS je závislá na interferonové dráze (Sato a kol., 2003) Ztráta LPS závislé indukce IRF7 by mohly tedy být důsledkem defektu v Jak/Stat signální dráze. Předběžné výsledky z naší laboratoře naznačují, že oba cystatiny částečně inhibují tuto signální dráhu (Lieskovská, nepublikováno). Rozdíl ve vlivu cystatinů na IRF7 indukci

po LPS stimulaci si vysvětlujeme tím, že SialoL2 negativně ovlivňuje také jiné signální dráhy vedoucí k indukci IRF7. Identifikace této signální dráhy, která je ovlivněná SialoL2 a ne SialoL je předmětem dalšího bádání. Zajímavé je, že u SialoL2 byla prokázána SAT aktivita na rozdíl od SialoL. Jak bylo prokázáno při *in vivo* experimentech, růst spirochet *Borrelia burgdorferi*, byl v kůži zvýšen jenom v přítomnosti SialoL2 a nikoli SialoL (Kotsyfakis a kol., 2010).

Jak již bylo řečeno, IRF7 je důležitý pro produkci interferonu typu I a právě produkce IFN  $\beta$  byla snížena vlivem klíštěcích slin v dendritických buňkách po stimulaci LPS (Lieskovská a kol., 2012). Můžeme se domnívat, že molekula podobná cystatinu SialoL2 ve slinách *Ixodes ricinus* by mohla být zodpovědná za snížení produkce IFN $\beta$  po TLR4 ligaci. Při interpretaci tohoto výsledku je nutné vzít v potaz, že transkript pro IRF7 má velmi krátký poločas rozpadu, jen 30 minut (Prakash a kol., 2006). A tak se nedá vyloučit, že v přítomnosti SialoL2 nebyla pozorována indukce IRF7 v důsledku změněné kinetiky a k indukci IRF7 mohlo dojít dříve nebo naopak později. Experiment, který by sledoval kinetiku IRF7 indukce v několika časových intervalech by potvrdil či vyloučil tuto možnost.

Genová exprese IRF7 byla sledována i po stimulaci DC s virovými ligandy. K indukci IRF7 došlo až po 16ti hodinách, IRF7 po stimulaci Poly (I:C) a imiquimodem. Vlivem SialoL byla pozorována mírná suprese, takže efekt byl obdobný jako při stimulaci LPS.

## 6. Souhrn

- Sání nymf a dospělců *Ixodes ricinus* pozitivně ovlivňovalo replikaci viru klíšťové encefalitidy *in vivo*.
- V přítomnosti slin klíštěte *Ixodes ricinus* byla snížena koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a mírně i koncentrace IFN $\gamma$  v séru myší infikovaných virem klíšťové encefalitidy.
- Klíštěcí cystatiny SialoL ani SialoL2 neovlivnily LPS indukovanou genovou expresi interferon regulačního faktoru 4 (IRF4) v dendritických buňkách.
- Samotné klíštěcí cystatiny signifikantně zvýšily genovou expresi IRF4 v dendritických buňkách a to v obou časových intervalech po 6 a 16 hodinách.
- Klíštěcí cystatin SialoL2, ale ne SialoL zcela inhiboval LPS indukovanou genovou expresi interferon regulačního faktoru 7 (IRF7) v dendritických buňkách.

## 7. Seznam zkratek

CNS	centrální nervová soustava
IRF	interferon regulační faktor
IL	interleukin
IFN	interferon
IKK	I $\kappa$ B kináza
IRAK	kináza asociovaná s interleukinovým receptorem
ISRE	interferonem stimulované elementy
JAK	kinázy rodiny Janus
LPS	lipopolysacharid
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MyD88	myeloidní diferenciační protein 88
NF- $\kappa$ B	transkripční faktor (angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)
Poly (I:C)	farmakologický analog dsRNA (angl. polyinosinic-polycytidylic acid)
RIG	receptor rozpoznávající patogeny
RS	Respirační syncytiální virus
STAT	transkripční faktor (angl. Signal Transducer and Activator of Transcription)
TBK	serin/threoninová protein kináza
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor, cytoplazmatická doména f TLR4 receptoru
TIRAP	TIR doména obsahující adaptorový protein (angl. TIR domain-containing adaptor protein)
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis faktor
TRAF	transkripční faktor spojená s TNF receptorem (angl. TNF receptor associated factor)
TRAM	adaptorová molekula spojována s TRIF (angl. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	TIR doména obsahující adaptor indukující IFN (angl. TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$ )
VKE	virus klíšťové encefalidity
VSV	virus vesikulární stomatidy

## 8. Seznam literatury

**Aderem, A., Ulevitch, R. J. 2000.** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.

**Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., Miyake, K. 2000.** Cutting edge: Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology* 164: 3471-3475.

**Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. 2001.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2: 675-680.

**Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.

**Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. Flavell, R. A. 2001.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.

**Baker, D. G., Woods, T. A., Butchi, N. B., Morgan, T. M., Taylor, R. T., Sunyakumthorn, P., Mukherjee, P., Lubick, K. J., Best, S. M., Peterson, K. E. 2012.** TLR7 suppresses virus replication in neurons, but does not alter viral pathogenesis in a mouse model of Langkat virus infection. *The Journal of General Virology*: doi:10.1099/vir.0.043984-0 v tisku

**Bell D., Young, J. W., Banchereau, J. 1999.** Dendritic cell. *Advances in Immunology* 72: 255-324.

**Bowie, A. G., Hago, I. R. 2005.** The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular Immunology* 42: 859-867.

**Bradford, M. M. 1976.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

**Cavassani, K. A., Aliberti, J. C., Dias, A. R., Silva, J. S., Ferreira, B. R. 2005.** Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 114: 235-245.

**Darnell, J. E. 1998:** Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *The Journal of Interferon and Cytokine Research* 18: 549-554.

**de Madrid and Porterfield, 1969.** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40: 113-121.

**Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Sousa, R., C. 2004.** Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531.

**Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M., Hufert, F. T. 2010.** Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8: 213-222.

**Dror, N., Alter-Koltunoff, M., Azriel, A., Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., Zeligson, S., Morgenstern, A., Tamura, T., Hauser, H., Rechavi, G., Ozato, K., Levi, B. Z. 2007.** Identification of IRF-8 and IRF-1 target genes in activated macrophages. *Molecular Immunology* 44: 338-346.

**Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., Ashish, Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincon, M., Krueger, J. K., Fikrig, E., Yengo, C. M., Anguita, J. 2006.** Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology* 177: 6579-6583.

**Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., Titus, R., G. 2001.** Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Immunology* 166: 4319-4326.



**Gwakisa, P., Yoshihara, K., Long To, T., Gotoh, H., Amano, F., Momotani, E. 2001.** Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Veterinary Parasitology* 99: 53-61.

**Ferreira, B. R., Silva, J. S. 1999.** Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology* 96: 434-439.

**Fialová, A., Cimburek, Z., Iezzi, G., Kopecký, J. 2010.** *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and infection* 12: 580-585.

**Francischetti, I. M. B., Sá-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M. C. 2009.** The role of tick saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* 14: 2051-2088.

**Frauschuh, A., Power, C. A., Deruaz, M., Ferreira, B. R., da Silva, J. M., Teixeira, M. M., Dias, J., Martin, T., Wells, T. N., Proudfoot, A. E. 2007.** Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 27250-27258.

**Gabriele, L., Ozato, K. 2007.** The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 18: 503-510.

**Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P. 2007.** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 2007 361: 80-92.

**Hajnická, V., Fuchsberger, N., Slovák, M., Kocakova, P., Labuda, M., Nuttall, P. A. 1998.** Tick salivary gland extracts promote virus growth in vitro. *Parasitology* 116: 533-538.

**Hajnicka, V., Vancova, I., Kocakova, P., Slovak, M., Gasperik, J., Slavikova, M., Hails, R. S., Labuda, M., Nuttall, P. A. 2005.** Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130: 333-342.

**Haller, O., Kochs, G., Weber, F. 2006.** The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344:119-130.

**Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., Taniguchi, T. 1993.** Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259: 971-974.

**Hayasaka, D., Nagata, N., Hasegawa, H., Sata, T., Suzuki, R., Gould, E. A., Takashima, I., Koike, S. 2009.** Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390: 139-150.

**Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., Aderem, A. 2001.** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 410: 1099-1103.

**Hellman, P., Eriksson, H. 2007.** Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Human Immunology* 68:324-333.

**Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. 2000.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.

**Honda, K., Taniguchi, T. 2006.** IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology* 6: 644-658.

**Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T. N. 2005.** IRF7 is the master regulator of type-I interferon dependent immune responses. *Nature* 434: 772-777.

**Honma, K., Udono, H., Kohno, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T., Kumatori, A., Suzuki, S., Matsuyama, T., Yui, K. 2005.** Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 16001-16006.

**Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. 1999.** Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *The Journal of Immunology* 162: 3749-3752.

**Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S. 2002.** Differential involvement of IFN $\beta$  in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *International Immunology* 14: 1225-1231.

**Hsing, L. C., Rudensky, A. Y. 2005.** The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews* 207: 229-241.

**Jones, L. D., Davies, C. R., Williams, T., Cory, J., Nuttall, P. A. 1991.** Non-viraemic transmission of Thogoto virus: vector efficiency of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 846-848.

**Kawai, T., Akira, S. 2010.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11: 373-384.

**Kaisho, T., Akira, S. 2001.** Dendritic cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends in Immunology* 22: 78-83.

**Kopecký, J., Kuthejlová, M., Pechová, J. 1999.** Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology* 21: 351-356.

**Kotsyfakis, M., Sa-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M. 2006.** Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 26298-26307.

**Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. 2007.** Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 29256-29263.

**Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M. 2008.** Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *The Journal of Immunology* 181: 5209-5212.

**Kotsyfakis, M., Horká, H., Salát, J., Andersen, J. F. 2010.** The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular Microbiology* 77: 456-470.

**Kovář, L., Kopecký, J., Říhová, B. 2002.** Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research* 88: 1066-1072.

**Kunz, C. 2003.** TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 21: 50-55.

**Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., Finberg, R. W. 2000.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology* 1: 398-401.

**Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E. 2002.** Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 10083-10089.

**Lieskovská, J., Kopecký, J. 2012.** Tick saliva suppresses IFN signalling in dendritic cells upon *Borrelia afzelii* infection. *Parasite Immunology* 34: 32-39.

**Lindenbach, B. D., Rice, C. M. 2003.** Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research* 59: 23-61.

**Lippert, U., Artuc, M., Grutzkau, A., Moller, A., Kenderessy-Szabo, A., Schadendorf, D., Norgauer, J., Hartmann, K., Schweitzer-Stenner, R., Zuberbier, T. 1998.** Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *The Journal of Immunology* 161: 2600-2608.

**Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., Gilliet, M. 2001.** Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology* 2: 585-589.

**Liu, Y., J. 2005.** IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology* 23: 275-306.

**Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C<sub>T</sub>) Method. *Methods* 25: 402-408.

**Logar, M., Arnez, M., Kolbl, J., Avsic-Zupanc, T., Strle, F. 2000.** Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults. *Infection* 2000 28:74-77.

**Mandl, C. W. 2005.** Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111: 161-174.

**Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. 2004.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25: 677-686.

**Marié, I., Durbin, J. E., Levy, D. E. 1998.** Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *European Molecular Biology Organization Journal* 17: 6660-6669.

**McNally, K. L., Mitzel, D. N., Anderson, J. M., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Myers, T. G., Godinez, A., Wolfinbarger, J. B., Best, S. M., Bloom, M. E. 2012.** Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection. *Ticks and tick-borne diseases* 3: 18-26.

**Mittrucker, H. W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T. M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P. S., Mak, T. W. 1997.** Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275: 540-543.

**Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., Honda, K. 2005.** Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF4. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 15989-15994.

**Nuttall, P. A., Labuda, M. 2004.** Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129: 177-189.

**Obermajer, N., Jevnikar, Z., Doljak, B., Kos, J. 2008.** Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connective Tissue Research* 49: 193-196.

**Ozato, K., Taylor, P., Kubota, T. 2007.** The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 20065-20069.

**Pestka, S., Krause, C. D., Walter, M. R. 2004.** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202: 8-32.

**Prakash, A., Levy, D. E. 2006.** Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 50-56.

**Ramachandra, R. N., Wikel, S. K. 1992.** Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *The Journal of Medical Entomology* 29: 818-826.

**Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E. 2005.** The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436: 573-577.

**Richardson, R. J., Dixon, J., Malhotra, S., Hardman, M. J., Knowles, L., Boot-Handford, R. P., Shore, P., Whitmarsh, A., Dixon, M. J. 2006.** Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nature Genetics* 38: 1329-1334.

**Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C. H., Koch, F., Stoitzner, P. 2003.** Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 111: 725-740.

**Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., Akira, S. 2003.** Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology* 171: 4304-4310.

**Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., Miyake, K. 2004.** Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology* 16: 961-969.

**Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T. 2000.** Distinct and essential roles of transcription factors IRF3 and IRF7 in response to viruses for IFN $\alpha/\beta$  gene induction. *Immunity* 13: 539-548.

**Sa-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. 2007.** Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *The Journal of Immunology* 179: 1497-1505.

**Sa-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M., Andersen, J. F., Shi, G. P., Chavakis, T., Ribeiro, J. M., Kotsyfakis, M. 2009.** The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *The Journal of Immunology* 182: 7422-7429.

**Sciammas, R., Shaffer, A. L., Schatz, J. H., Zhao, H., Staudt, L. M., Singh, H. 2006.** Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25: 225-236.

**Schoeler, G. B., Manweiler, S. A., Wikel, S. K. 1999.** *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Experimental Parasitology* 92: 239-248.

**Sharma, S., ten Oever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., Hiscott, J. 2003.** Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300: 1148-1151.

**Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., Kopecký, J. 2008.** Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *The Journal of Immunology* 180: 6186-6192.

**Stiasny, K., Heinz, F. X. 2006.** Flavivirus membrane fusion. *The Journal of General Virology* 87: 2755-2766.

**Styer, L. M., Lim, P. Y., Louie, K. L., Albright, R. G., Kramer, L. D., Bernard, K. A. 2011.** Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *The Journal of Virology* 85: 1517-1527.

**Süss, J. 2008.** Tick-borne encephalitis in Europe and beyond the epidemiological situation as of 2007. *Euro surveillance: European communicable disease bulletin* 13: 1-8.

**Taylor, P., Tamura, T., Ozato, K. 2006.** IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Research* 16: 134-140.

**Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. 2003.** Toll-like receptors. *Annual Review Immunology* 21: 335-376.

**Takeda, K., Akira, S. 2005.** Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17: 1-14.



**Takeuchi, O., Akira, S. 2009.** Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews* 227: 75-86.

**Taniguchi, T., Takaoka, A. 2001.** A weak signal for strong responses: interferon  $\alpha/\beta$  revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 378-386.

**Town, T., Bai, F., Wang, T., Kaplan, A. T., Qian, F., Montgomery, R. R., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Fikrig, E. 2009.** Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* 30: 242-253.

**Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. C. 2000.** Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723.

**Wikel, S., K. 1996.** Tick modulation of host cytokines. *Experimental Parasitology* 84: 304-309.

**Yamagata, T., Nishida, J., Tanaka, S., Sakai, R., Mitani, K., Yoshida, M., Taniguchi, T., Yazaki, Y., Hirai, H. 1996.** A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Molecular Cellular Biology* 16: 1283-1294.