

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Vliv rekombinantních proteinů z klíštěcích slin na
aktivitu myších NK buněk**

Bakalářská práce

Zuzana Beránková

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2015

Beránková, Z., 2015: Vliv rekombinantních proteinů z klišťecích slin na aktivitu myších NK buněk. [The influence of recombinant proteins from tick saliva on the activity of murine NK cells. Bc. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to investigate the influence of selected recombinant proteins (tick salivary cystatins) and tick saliva derived from *Ixodes ricinus* on the cytotoxic activity of murine NK cells *in vitro*. We determined the suppressive effect of tick saliva and two tick salivary cystatins on NK cell activity.

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

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

V Českých Budějovicích dne.....

.....

Zuzana Beránková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat především svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za obrovskou pomoc a cenné rady, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Velký dík patří také paní Evě Výletové nejen za pomoc s buněčnými liniemi, ale i za celkové usnadnění práce v laboratoři. Nakonec musím poděkovat také svojí rodině a svému příteli a to jak za psychickou podporu, tak i za kritické a podnětné rady při psaní této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. KLÍŠTĚ	1
1.2. KLÍŠTĚCÍ SLINY	2
1.2.1. SLINNÉ ŽLÁZY	2
1.2.2. SLOŽENÍ SLIN	2
1.2.3. SAT	5
1.3. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	6
1.4. NK BUŇKY	9
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODY	13
3.1. MATERIÁL	13
3.1.1. MYŠI	13
3.1.2. BUNĚČNÉ LINIE	13
3.1.3. KLÍŠTĚCÍ SLINY	13
3.1.4. REKOMBINANTNÍ PROTEINY	13
3.2. METODY	14
3.2.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA CYTOTOXICKOU AKTIVITU NK BUNĚK <i>IN VITRO</i>	14
3.2.1.1. Izolace NK buněk	14
3.2.1.2. Preinkubace se slinami	15
3.2.1.3. Vlastní cytotoxický test	15
3.2.1.4. Měření cytotoxické aktivity NK buněk	16
3.2.2. VLIV CYSTATINŮ NA CYTOTOXICKOU AKTIVITU NK BUNĚK <i>IN VITRO</i>	19
3.2.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	19
4. VÝSLEDKY	20
4.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA AKTIVITU NK BUNĚK	20
4.2. VLIV KLÍŠTĚCÍCH CYSTATINŮ NA AKTIVITU NK BUNĚK	22
5. DISKUZE	25
6. ZÁVĚR	29
7. SEZNAM ZKRATEK	30
8. SEZNAM LITERATURY	31

1. ÚVOD

1.1. KLÍŠŤĚ

Klíšťata jsou obligátní, krev sající ektoparazité, kteří jsou rozšířeni téměř po celém světě a parazitují na velmi širokém spektru hostitelů zahrnujícím savce, ptáky, plazy a v několika případech i obojživelníky. Zároveň se jedná o přenašeče velkého množství patogenů (po komárech jsou druhými nejčastějšími přenašeči lidských patogenů). Co se variability přenášených patogenů týče, jsou klíšťata na prvním místě (Sonenshine, 1991).

V současné době jsou klíšťata taxonomicky řazena do kmene členovci (Arthropoda), třídy pavoukovci (Arachnida), podtřídy roztoči (Acari), nadřádu Parasitiformes, řádu Ixodida a do nadčeledě Ixodoidea (Krantz & Walter, 2009), která se dále dělí na 3 základní čeledi: Ixodidae (692 druhů), Argasidae (186 druhů) a Nuttallielidae (1 druh). Klíšťata z čeledi Ixodidae (zahrnující 12 rodů) jsou známá pod názvem „tvrdá“, což je odvozeno od charakteristického znaku této skupiny, kterým je sklerotizovaný hřbetní štítek (scutum) pokrývající horní část těla. Naopak klíšťata z čeledi Argasidae (s 6 rody) jsou nazývána „měkká“ podle jejich ohebné kožovité kutikuly s absencí hřbetního štítu. Ixodidae se dále dělí do dvou skupin, na Prostriata s jediným rodem *Ixodes* a na Metastriata se zbývajícími 11 rody. Čeď Nuttallielidae zahrnuje pouze jediný druh *Nuttalliella namaqua*, který má znaky jak „tvrdých“ tak i „měkkých“ klíšťat a navíc některé znaky typické pouze pro tento druh (Nava et al., 2009).

„Tvrdá“ a „měkká“ klíšťata se ovšem neliší pouze vzhledem a stavbou, ale i strategií při získávání potravy. Klíšťata z čeledi Argasidae setrvávají na svém hostiteli přichycena celkem krátce. Dokončení procesu sání krve jim zabere nanejvýš několik hodin a v některých případech pouze několik minut, přičemž zvětší svoji tělesnou hmotnost 5krát až 10krát. Naopak klíšťata z čeledi Ixodidae zůstávají na hostiteli pevně přichycena po dobu několika dní až týdnu, než dokončí sání. Pevnému přichycení napomáhá tvorba tzv. cementu či tmelu, který je vylučován slinnými žlázami a upevňuje sací ústrojí v ráně. Hmotnost klíšťat po nasycení se může zvýšit až 100krát (Sonenshine, 1991; Sauer et al., 1995).

Poškození kůže hostitele při průniku sacího aparátu klíštěte a jeho fixování v ráně by mělo za běžných okolností vyvolat silnou hemostatickou, zánětlivou a imunitní odpověď, která by klíštěti za normálních okolností znemožnila dlouhodobé sání. Klíšťata si proto musela během koevoluce se svým hostitelem vyvinout řadu mechanismů, jak se účinně chránit před odmítavou odpovědí ze stran hostitele (Wikel, 1996). Tato ochrana je

zajišťována pomocí bioaktivních molekul obsažených v klíštěcích slinách, které jsou během sání vylučovány do rány.

1.2. KLÍŠTĚCÍ SLINY

1.2.1. SLINNÉ ŽLÁZY

Sliny klíšťat jsou produkovány ve specializovaném párovém orgánu - ve slinných žlázách. Slinné žlázy se nacházejí v anterolaterální oblasti tělní dutiny klíšťat a jsou tvořeny velkým množstvím lalůček (alveolů), které jsou pospojované slinnými vývody. Pomocí těchto vývodů jsou vzniklé sliny odváděny do salivaria, které se nachází mezi chelicerami a hypostomem. Odtud jsou sliny sekretovány do rány v kůži hostitele (Kemp & Tatchell, 1971; Sauer et al., 1995). Lalůčky tvořící slinné žlázy mohou být dvou základních typů – agranulární (typ I) a granulární (zahrnující typy II, III, IV). Jednotlivé typy jsou tvořeny různými druhy buněk, které sekretují odlišné bioaktivní látky (Sauer et al., 2000; Bowman & Sauer, 2004; Bowman et al., 2008).

V průběhu sání zvětšují slinné žlázy svůj objem až 25krát a dochází rovněž ke změně ve složení vylučovaného sekretu (např. výrazně stoupá syntéza některých proteinů a lipidů) (McSwain et al., 1982; Shipley et al., 1993). Po odpadnutí klíštěte z hostitele dochází k opětovné degeneraci slinných žláz procesem apoptózy. Vývin, degenerace a množství sekretu slinných žláz jsou řízeny neuro-hormonálně (Kaufman, 1991; Bowman et al., 2008).

Slinné žlázy plní kromě výše popsaných funkcí i funkci osmoregulační. Během sání umožňují klíštěti koncentrovat živiny z nasáté krve a to takovým způsobem, že přebytečnou vodu spolu s ionty vylučují formou slin zpět do hostitele (Tatchell, 1967; Kaufman & Phillips, 1973).

1.2.2. SLOŽENÍ SLIN

Jak již bylo výše uvedeno, v průběhu sání klíštěte dochází ve slinných žlázách k syntéze a následné sekreci mnoha bioaktivních látek zahrnujících i ty, které mají za úkol tlumit obranné mechanismy hostitele. Jedná se o látky zamezující srážení krve a agregaci krevních destiček, dále vazodilatační a imunomodulační látky a rovněž protizánětlivé látky tlumící svědění a bolest. Složení slin a konkrétní účinek dodnes identifikovaných látek shrnuje řada prací (např. Anderson & Valenzuela, 2008; Francischetti et al., 2009; Kazimírová & Štibrániová, 2013; Wikel, 2013).

Látky tlumící svědění a bolest

Jako první jsou do rány hostitele uvolňovány látky, jejichž cílem je co nejvíce snížit riziko, že hostitel zaregistruje přísátí a následné sání klíštěte. Sliny některých druhů klíšťat obsahují kininázy (Ribeiro & Mather, 1998) a histamin vazající lipokaliny (Paesen et al., 2000). Tyto látky jsou schopné tlumit bolest a svědění, které vznikají během stimulace konkrétního typu receptorů po uvolnění histaminu a bradykininu z poškozené tkáně hostitele (Schmelz, 2010).

Antihemostatické faktory

Modulace hemostatických mechanismů hostitele je pro klíšťata základním předpokladem pro úspěšné sání. K inhibici hemostázy dochází prostřednictvím látek s vazodilatačním účinkem, dále pomocí látek bránící agregaci krevních destiček a prostřednictvím molekul inhibujících koagulační kaskádu (Mans, 2010; Kazimírová & Štibrániová, 2013).

Vazodilatační látky zahrnují deriváty lipidů jako jsou prostaglandin a prostacyclin (Riberio et al., 1988, 1992) a dále histamin uvolňující faktor (tHFR) z klíštěte *Ixodes scapularis* (Dai et al., 2010) a serin-proteázový inhibitor (serpin) z klíštěte *Ixodes ricinus* (Chmelař et al., 2011).

Látky ze slin inhibující koagulační kaskádu jsou nejčastěji zaměřeny na faktor Xa (Ibrahim et al., 2001; Francischetti et al., 2002; Narasimhan et al., 2002). Dále dochází k inhibici klíčového enzymu v procesu hemostázy - trombinu (Koh & Kini, 2009). Byla pozorována také inhibice kontaktní fáze, tj. kontakt receptorů destiček s obnaženým subendoteliálním kolagenem (Decrem et al., 2009).

Správná funkce krevních destiček je narušována různými způsoby, které zahrnují hydrolyzu ADP a ATP (ADP uvolněné z poškozených buněk a aktivovaných destiček indukuje za normálních okolností agregaci krevních destiček), znemožnění aktivace receptorů krevních destiček (integrinů), což má za následek neschopnost destiček agregovat. Tyto a další možnosti inhibice krevních destiček podrobně shrnul ve své práci Francischetti (2010).

Imunomodulační látky

Klíštěcí sliny popř. extrakt ze slinných žláz (SGE) obsahují látky mající vliv jak na přirozenou (nespecifickou), tak i získanou (specifickou) imunitu hostitele.

První obrannou linií přirozené imunity při zranění či infekci představují neutrofilové. Sliny z *I. scapularis* inhibují schopnost fagocytózy a zabíjení u neutrofilů (Ribeiro et al., 1990). Lipokalin ze slin *I. ricinus* snižuje aktivaci a chemotaxi neutrofilů (Beaufays et al., 2008) a mnoho druhů klíšťat syntetizuje ve svých žlázách inhibitory interleukinu-8 (chemoatraktant pro neutrofilové) i jiných chemokinů (Hajnická et al., 2001; Vančová et al., 2010). Tyto proteiny vyznačující se schopností vázat chemokiny jsou souhrnně označovány jako evasiny (Frauenschuher et al., 2007; Déruaz et al., 2008).

Byl prokázán účinek SGE z klíšťat *Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, *Haemaphysalis inermis* a *I. ricinus* na aktivitu NK buněk (Kubeš et al., 1994, 2002; Kopecký & Kuthejlová, 1998).

Působením slin či SGE mnoha druhů tvrdých klíšťat (*I. scapularis*, *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. uriae*) dochází k inhibici aktivace alternativní cesty komplementu (Ribeiro, 1987; Lawrie et al., 1999) a účinkem SGE z klíštěte *Ornithodoros moubata* dochází k modulaci nejen alternativní, ale i klasické cesty aktivace komplementu (Nunn et al., 2005).

Klíštěcí sliny mají vliv také na dendritické buňky. Mohou například inhibovat jejich diferenciaci a maturaci (Cavassani et al., 2005; Skallová et al., 2008), snižovat expresi receptorů pro chemokiny na povrchu dendritických buněk a znesnadňovat tím jejich migraci (Oliveira et al., 2008) nebo mohou snižovat schopnost dendritických buněk prezentovat antigeny (Skallová et al., 2008). Molekuly obsažené ve slinách také redukuje schopnost dendritických buněk vylučovat některé cytokiny (IFN- α , INF- γ , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), které hrají důležitou roli při aktivaci a diferenciaci T-lymfocytů (Sá-Nunes et al., 2007; Preston et al., 2013).

Ve slinách mnoha druhů klíšťat byly nalezeny látky potlačující proliferaci T i B lymfocytů a také látky se schopností měnit skladbu cytokinů produkovaných T lymfocyty. Vlivem slin dochází například k potlačení prozánětlivých Th1 cytokinů (IL-2 a INF- γ) a naopak je zvýšená produkce Th2 cytokinů (IL-4 a IL-10) (Ferreira & Silva, 1999; Schoeler et al., 1999). Ze slin různých klíšťat bylo izolováno a identifikováno množství proteinů inhibujících T lymfocyty. Jedná se např. o protein Iris izolovaný ze slinných žláz *I. ricinus*, který potlačuje proliferaci T lymfocytů (Leboulle et al., 2002), ze slin *I. scapularis* lze jmenovat např. Salp15 (Anguita et al., 2002) a IL-2 vázající protein (Gillespie et al., 2001).

Významnou skupinu proteinů s imunosupresním a protizánětlivým účinkem tvoří inhibitory cysteinových proteáz - cystatiny. Cystatinů je velké množství a byly nalezeny ve slinách mnoha klíštěcích druhů (Schwarz et al., 2012). Patří mezi ně např. sialostatin L a

sialostatin L2 izolované ze slin *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2006; 2007). Sialostatin L má protizánětlivé účinky a inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů a LPS indukovanou maturaci dendritických buněk (Kotsyfakis et al., 2006). Naopak sialostatin L2 nemá modulační účinek na antigen prezentující buňky, ale je důležitý pro úspěšné sání klíštěte (Kotsyfakis et al., 2007).

Molekuly s antihemostatickým a imunomodulačním účinkem identifikované ve slinách klíštěte *I. ricinus* (jehož sliny byly použity v experimentální části práce) shrnuje následující tabulka (Tab. I).

Tab. I: Proteiny ze slin klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*).

typ molekuly	název	funkce	citace
inhibitory agregace krevních destiček	IRS-2	inhibice trombinu, katepsinu G a chymázy	Chmelař et al., 2011
antikoagulanty	Ir-CPI	inhibice vnitřní dráhy koagulační kaskády a fibrinolýzy	Decrem et al., 2009
inhibitory komplementu	IRAC I, II	inhibice komplementu	Daix et al., 2007
imunomodulátory	Iris	inhibice proliferace T lymfocytů, modulace produkce cytokinů	Leboulle et al., 2002
	BIP	inhibice proliferace B lymfocytů	Hannier et al., 2004
	Ir-LBP	inhibice neutrofilů	Beaufays et al., 2008
	IRS-2	inhibice diferenciac Th17 lymfocytů	Páleníková et al., 2015

1.2.3. SAT

Imunomodulační efekt klíštěcích slin nezajišťuje pouze úspěšné sání. Oslabením obranných mechanismů hostitele se vytváří unikátní prostředí, které poskytuje příležitost pro přenos patogenů mezi jejich vektorem a hostitelem a umožňuje následnou proliferaci patogenů.

Tento způsob přenosu, tzv. slinami aktivovaný přenos (saliva-activated transmission), krátce SAT efekt, byl poprvé popsán u přenosu Thogoto viru (Jones et al., 1989). Jako přímý důkaz SAT efektu posloužil experiment, ve kterém byl porovnáván počet nymf, jež se nakazily Thogoto virem během sání na morčatech. Morčatům byl do místa, kde nymfy sály, vpíchnut Thogoto virus - buď samotný, nebo spolu s SGE z klíštěte *Rhipicephalus*

appendiculatus. Přítomnost SGE způsobila, že počet nakažených nymf z morčete s inokulovanou kombinací viru a SGE byl v porovnání s inokulací samotného viru desetkrát vyšší (Jones et al., 1989, 1990). Při určení konkrétních bioaktivních molekuly z klíštěcích slin, které se podílejí na SAT efektu, se nabízí řada kandidátů, mezi něž patří např. histamin vázající proteiny (histacaliny), imunoglobulin vázající proteiny, inhibitory cytokinů a molekuly modulující činnost leukocytů (Nuttall & Labuda, 2004). Mezi první popsané SAT faktory patří proteiny Salp15 (Ramamoorthi et al., 2005) a sialostatin L2 z klíštěte *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis et al., 2010). Je pravděpodobné, že jednotlivé SAT faktory jsou u různých druhů vektorů a patogenů odlišné a jsou nejspíš závislé i na druhu hostitele (Nuttall & Labuda, 2004).

Od popsání SAT efektu u Thogoto viru byl tento způsob přenosu prokázán i u řady dalších patogenů a jejich přenašečů a to nejen u klíšťat, ale i u jiných krev sajících členovců. Jmenovat lze např. přenos spirochet *Borrelia burgdorferi* u klíštěte *I. scapularis* (Zeidner et al., 2002) nebo prokázání SAT efektu při přenosu viru klíšťové encefalitidy u klíštěte *I. ricinus* (Labuda et al., 1993a).

1.3. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) se řadí mezi arboviry, což je heterogenní skupina virů, jejichž společným znakem je způsob přenosu, který je zprostředkováván prostřednictvím krev sajících členovců. Vektorem pro VKE jsou klíšťata z čeledi Ixodidae (především *I. ricinus* a *I. persulcatus*), ze kterých je virus přenášen na cílové savčí hostitele (Gritsun et al., 2003). VKE je původcem klíšťové encefalitidy, závažného onemocnění napadajícího nervovou soustavu, kterého jsou u lidí ročně zaznamenány tisíce případů napříč celou Evropou a Asií (Mansfield et al., 2009).

Taxonomicky se VKE řadí do rodu *Flavivirus* (čeleď Flaviviridae), jež zahrnuje cca 70 různých druhů virů, z nichž velkou část tvoří arboviry způsobující významná lidská onemocnění, jako jsou např. virus dengue, virus japonské encefalitidy, virus západního Nilu či virus žluté zimnice (Kuno et al., 1998). Flaviviry se dělí do několika podskupin, přičemž VKE se řadí do skupiny virů přenášených klíšťaty, které jsou si navzájem geneticky či antigenně příbuzné a souhrnně se nazývají viry komplexu klíšťových encefalitid (Calisher, 1988). Patří mezi ně např. virus omské hemoragické horečky, virus Louping-ill, virus Langat, virus horečky kjasanurského lesa či virus Powassan (Grard et al., 2007).

Na základě serologické a sekvenční analýzy lze rozlišit tři základní subtypy VKE – evropský, sibiřský a dálněvýchodní (Ecker et al., 1999). Evropský subtyp je přenášen klíštětem *I. ricinus* a je rozšířen na většině území Evropy. Zbylé dva subtypy využívají jako vektor především klíště *I. persulcatus* a objevují se na území Sibiře, Finska, Baltických států (sibiřský subtyp) a ve střední a východní části Asie včetně Číny a Japonska (dálněvýchodní subtyp) (Süss, 2011).

Struktura virionu

Flaviviry jsou malé, obalené viry se sférickou strukturou, v průměru o velikosti 40-60 nm (Lindenbach & Rice, 2003). Jejich genom je tvořen jednovláknovou RNA pozitivní polaritě o velikosti přibližně 11-12 kb a vyznačuje se přítomností pouze jediného otevřeného čtecího rámce (ORF – open reading frame). Na obou koncích čtecího rámce jsou netranslatované oblasti (UTR - untranslated region). 5'UTR je zakončena čepičkou, která je důležitá pro stabilitu a translaci mRNA. 3'UTR naopak není zakončena poly(A) koncem, jak je tomu u buněčné mRNA (Wengler et al., 1978). Genom kóduje pouze tři strukturální proteiny – kapsidový protein C, membránový protein M (tvořen z prekurzoru prM) a glykoprotein E tvořící obal. Kromě zmíněných strukturálních proteinů je dále kódováno sedm nestructurálních – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Chambers et al., 1990).

Přenos viru

K přenosu VKE na jeho vektorového hostitele (tj. klíště) dochází nejčastěji během sání klíštětem na nakaženém savčím hostiteli. Po nasátí infikované krve se virus dostane do střeva klíštěte, kde dojde k jeho pomnožení v buňkách střevní stěny. Následuje infekce buněk slinných žláz a uvolnění viru do klíštěcích slin, prostřednictvím kterých může být virus přenesen na dalšího hostitele, na kterém bude nakažené klíště sát (Nuttall et al., 1994). Důležitou roli přitom hraje doba, po kterou je klíště na hostiteli přisáto, neboť množství virových částic ve slinách se v průběhu sání může zvýšit až stokrát, čímž značně vzrůstá pravděpodobnost přenosu viru (Alekseev & Chunikhin, 1989). Může docházet také k přímému přenosu z infikovaného klíštěte na jiné neinfikované klíště během tzv. sousání (co-feeding), kdy infikované a neinfikované klíště sají v těsné blízkosti na témže hostiteli (Labuda et al., 1993b). K přenosu VKE přitom dochází i v případě, že není u hostitele pozorována detekovatelná virémie. Díky tomu hraje tento způsob přenosu klíčovou roli při šíření VKE a jeho přežívání v přírodě (Labuda et al., 1993c). V případě, že se klíště nakazí

VKE, zůstává infekční po celou dobu jeho životního cyklu, neboť je uskutečňován transstadiální přenos z jednoho vývojového stádia na druhé. Navíc může docházet i k transovariálnímu přenosu z ovarií infekční samice na nakladená vajíčka (Gritsun et al., 2003).

Při cirkulaci VKE v přírodě hrají důležitou roli především drobní hlodavci, kteří slouží jako významný rezervoár viru (Süss, 2003). Jiní klíštěcí hostitelé, jako jsou např. větší savci (jeleni, kozy, krávy, ovce aj.) či ptáci, nemají při přenosu viru velký význam, neboť u nich po nákaze virem nevzniká dostatečně velké virémie, která je důležitá pro další přenos VKE (Süss, 2003). Větší savci a ptáci však mohou hrát roli při přenosu infikovaných klíšťat do nových oblastí, čímž napomáhají rozšiřování areálu výskytu VKE (Jaenson et al., 1994).

Klinické příznaky a průběh onemocnění

Většina případů nákazy VKE vzniká po přisátí infikovaného klíštěte, ale jsou známé i případy, kdy došlo k nákaze po konzumaci infekčního nepasterizovaného mléka, především kozího (Süss, 2011). Po infekci VKE dochází nejprve k jeho pomnožení v místě vstupu do organismu (tj. v místě přisátí klíštěte), odkud se poté dostává pomocí Langerhansových buněk do spádových lymfatických uzlin (Haglund & Günther, 2003). Zde následuje jeho další replikace, virus je transportován do krve a vzniká virémie (Málková & Fraňková, 1959). Ta umožňuje rozšíření viru do dalších orgánů (slezina, játra, kostní dřev), odkud dochází k uvolňování viru a udržování virémie po dobu několika dnů (Haglund & Günther, 2003). Při déletrvající virémii může dojít k překonání hematoencefalitické bariéry a invazi do centrálního nervového systému (CNS), kde má replikace viru za následek vznik zánětu a lýzu či dysfunkci buněk (Dumpis et al., 1999; Růžek et al., 2010).

Onemocnění způsobené evropským subtypem VKE má ve většině případů dvoufázový průběh (Dumpis et al., 1999; Gritsun et al., 2003). Po uplynutí inkubační doby (v průměru 7 až 14 dní) se objeví příznaky první fáze, které mají podobu nespecifické chřipky - tj. únava, bolest hlavy, bolesti v oblasti beder, krční páteře a ramen doprovázené zvýšenou teplotou a zvracením (Gritsun et al., 2003). První fáze je často následována asymptomatickou periodou trvající 2 až 10 dní, během níž dochází k invazi viru do CNS, po které následuje druhá fáze onemocnění (Holzmann, 2003). Ta je charakterizována vysokou horečkou a typickými neurologickými symptomy, které se liší na základě toho, v jaké části CNS se infekce projeví. Virus může napadnout mozkové pleny (důsledkem zánětu vzniká meningitida neboli zápal mozkových blan), mozkový parenchym (vzniká encefalitida), míchu (myelitida) či míšň

kořeny (radikulitida). Virus zároveň ve většině případů nenapadá pouze jednu část CNS, ale dochází k různým kombinacím a průběh onemocnění může být velmi odlišný (Lindquist & Vapalahti, 2008). Klinický projev a průběh onemocnění se liší také v závislosti na konkrétním subtypu viru, který onemocnění vyvolal (Gritsun et al., 2003).

Imunitní odpověď hostitele

Invaze viru do organismu hostitele vyvolá ze strany hostitele výraznou specifickou i nespecifickou imunitní odezvu, která zahrnuje např. zvýšenou produkci interferonů typu I či aktivaci dendritických buněk a makrofágů, které jsou schopné likvidovat patogeny, produkovat prozánětlivé cytokiny a zároveň představují významné antigen-prezentující komponenty v imunitním systému (Dörrbecker et al., 2010). Na druhou stranu jsou citlivé na infekci VKE, dochází v nich k replikaci viru a mohou tím výrazně přispívat k šíření viru v organismu (Dörrbecker et al., 2010). Určitou roli při rozpoznávání a likvidaci buněk infikovaných VKE mohou mít i NK buňky, u nichž byla v odpovědi na infekci VKE pozorována výrazná aktivace (Vargin & Semenov, 1986). Ta však byla pouze přechodná a následovala po ní suprese aktivity NK buněk, což může naznačovat vznik jistého mechanismu, kterým virus inhibuje odpověď NK buněk (Vargin & Semenov, 1986).

1.4. NK BUŇKY

NK buňky (natural killer cells) se řadí do skupiny lymfocytů a tvoří nedílnou součást přirozené (nespecifické) imunitní odpovědi (Trinchieri, 1989). Díky své rychlé aktivaci hrají klíčovou roli při obraně proti patogenům v prvních dnech po jejich průniku do organismu, kdy teprve dochází k aktivaci a nástupu adaptivní složky imunity (Welsh & Zinkernagel, 1977). NK buňky vytváří imunitní odpověď proti řadě mikroorganismů (Bancroft, 1993), důležitá je především jejich funkce při obraně proti nádorovým a virem napadeným buňkám, které jsou schopné rozeznat a následně zneškodnit (Biron et al., 1999; Smyth et al., 2002).

NK buňky se vyskytují převážně v periferní krvi, plicích, játrech, slezině, kostní dřeni a v menším množství v lymfatických uzlinách a v brzlíku. Největší rezervoár NK buněk u myši představuje slezina, která u nich obsahuje 2-3 milióny NK buněk (Grégoire et al., 2007).

Jak u myších, tak u lidských NK buněk bylo charakterizováno několik rozdílných podskupin, které se liší funkcí či morfologickými rysy (Hayakawa & Smyth, 2006; Cooper et al., 2001).

Činnost NK buněk je regulována pomocí aktivačních a inhibičních signálů na základě toho, který ze signálů získá převahu. Pokud převáží aktivační signál, dojde k zabití cílové buňky, v případě převahy inhibičního signálu je aktivace NK buňky potlačena a k zabití nedojde (Lanier, 2008).

Aktivační signál vzniká po stimulaci aktivačních receptorů na povrchu NK buněk. Tyto receptory rozpoznávají určité ligandy exprimované na povrchu nádorových či virem napadených buněk (Lanier, 2008). Kromě přímé aktivace prostřednictvím aktivačních receptorů dochází ke stimulaci i pomocí cytokinů či chemokinů, jako jsou např. IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- α a IFN- β , které indukují proliferaci NK buněk a zesilují jejich cytotoxicitu (Biron et al., 1999; Marçais et al., 2013). Naopak inhibiční signál vzniká stimulací inhibičních receptorů, které rozpoznávají molekuly hlavního histokompatibilního systému I. třídy (MHC I), jež se za normálních okolností vyskytují na každé zdravé, jaderné buňce v těle (Ljunggren & Kärre, 1990). Nádorové či virem napadené buňky expresi MHC I snižují ve snaze uniknout CD8⁺ cytotoxickým T lymfocytům (CTL), které jsou schopné rozpoznat a následně zlikvidovat pouze ty napadené buňky, jež mají na svém povrchu MHC I molekuly (Seliger et al., 2006). Pokud NK buňka přijde do kontaktu s buňkou s normální expresí MHC I, inhibiční receptory na povrchu NK buňky rozpoznají molekuly MHC I, inhibiční signál převáží nad aktivačním a k aktivaci NK buňky nedojde (MacFarlane & Campbell, 2006). Pokud však NK buňka přijde do kontaktu s buňkou se sníženou expresí MHC I, nedojde ke spojení s inhibičními receptory a tím pádem ani k potlačení aktivačních signálů. Zároveň aktivační receptory rozeznávají specifické ligandy, které na svém povrchu exprimují nádorové či virem nakažené buňky. Výsledkem je aktivace NK buňky a následné spuštění cytotoxického procesu (Lanier, 2008).

Byla identifikována řada molekul sloužících jako inhibiční či aktivační receptory, popř. koreceptory (Campbell & Hasegawa, 2013). Na lidských NK buňkách byly nalezeny inhibiční receptory nazvané KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors), na myších NK buňkách receptory typu Ly49 (lymphocyte antigen 49 complex) a inhibiční receptor CD94/NKG2A byl nalezen na lidských i myších NK buňkách (Lanier, 1998). Mezi aktivační receptory identifikované na povrchu NK buněk patří např. NKG2D (Bauer et al., 1999) a skupina receptorů nazvaná NCR (natural cytotoxicity receptors), která v sobě zahrnuje tři typy receptorů - NKp30, NKp44 a NKp46 (Pessino et al., 1998; Vitale et al., 1998; Pende et al., 1999). Obě skupiny receptorů (NKG2D a NCR) mají význam při stimulaci NK buněk v odpovědi na nádorové buňky (Moretta et al., 2001). Dalšími aktivačními receptory jsou Fc γ

receptory (Fc γ RIIIA), které rozpoznávají Fc oblasti molekul IgG a po kontaktu s cílovou buňku označenou IgG se podílejí na spouštění ADCC (buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách) (Lanier et al., 1988). Mezi aktivační koreceptory patří např. 2B4 (Sivori et al., 2000). Ligandy pro konkrétní typy receptorů jsou v mnoha případech známy, pro některé však ještě ligandy, které po navázání spouští cytotoxicitu, nalezeny nebyly (Campbell & Hasegawa, 2013).

Cytotoxicita NK buněk může být zprostředkována dvěma způsoby. Jednou možností je přímá exocytóza cytolytických granul, z nichž dojde k uvolnění perforinů a granzymů, které narušují plasmatickou membránu cílové buňky a spouští apoptózu (Krzewski & Coligan, 2012). V druhém případě NK buňky exprimují ligandy FasL a TRAIL, které se vážou na receptory Fas a TRAIL-R (DR4, DR5) na cílových buňkách, čímž spouští rovněž proces apoptózy (Screpanti et al., 2001; Falschlehner et al., 2007).

NK buňky přitom neplní pouze funkci „přirozených zabíječů“, ale důležitá je i jejich role při produkci cytokinů (např. IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) a chemokinů (např. CCL3, CCL4, CCL5), které slouží nejen ke kontrole virové infekce, ale napomáhají i při pozdějším formování adaptivních složek imunity (Walzer et al., 2005). Působí také regulačně při kontaktu s endoteliálními a dendritickými buňkami, s makrofágy a T i B lymfocyty (Vivier et al., 2011).

2. CÍLE PRÁCE

1. Objasnit vliv klíčících slin na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.
2. Stanovit vliv vybraných rekombinantních proteinů (klíčících cystatinů) na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.
3. Srovnat dva použité testy sloužící ke stanovování aktivity NK buněk.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

3.1.1. MYŠI

V pokusech byly použity samice inbredního myšního kmene C3H/HeN (AnLab s.r.o.) ve stáří 5 až 6 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.2. BUNĚČNÉ LINIE

Pro pokusy byly použity YAC-1 buňky, které byly kultivovány při teplotě 37°C v médiu RPMI 1640 obohaceném o 5 % bovinního fetálního séra (BOFES), 1 % antibiotik (ATB), 1 % L-glutaminu (GL) a 0,1 % 2-merkaptoetanolu (ME) (Biosera).

YAC-1 buňky jsou buňky myšního lymfomu, které byly získány inokulací viru Moloneyho leukémie (MLV) novorozným myším kmenu A/Sn. YAC-1 buňky jsou citlivé k cytolytickému působení NK buněk a mohou být díky tomu využívány jako cílové buňky při stanovování cytotoxicity NK buněk (Kießling et al., 1975).

3.1.3. KLÍŠTĚCÍ SLINY

Sliny byly získány z dospělých samic klíšťat *I. ricinus*, které sály na morčeti po dobu 6 dnů. Nasátá klíšťata byla pomocí oboustranné lepicí pásky připevněna k podložním sklíčkům a na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena a následně zafixována skleněná kapilára. Na hřbetní část těla jim bylo kápnuto po 2 μ l 5% roztoku pilokarpinu (Sigma) v 95% ethanolu. Poté byla klíšťata umístěna do vlhké komůrky, kde byla inkubována po dobu dvou hodin při 37 °C a 3,5 % CO₂. Během této doby docházelo k vylučování slin do kapiláry. Vyprodukované sliny byly sterilizovány filtrací přes bakteriální filtr o velikosti pórů 0,22 μ m a byly uchovány při teplotě -70°C.

Obsah proteinů ve slinách byl určen pomocí metody pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bradford, 1976).

3.1.4. REKOMBINANTNÍ PROTEINY

V pokusech byly použity tři typy rekombinantních proteinů, které budou z důvodů potenciální patentové aplikace na tyto proteiny v celé práci označovány jako X1, X2 a X3. Všechny tři proteiny se řadí do skupiny inhibitorů cysteinových proteáz (cystatinů) a jsou

obsaženy ve slinách klíštěte *I. ricinus*. Rekombinantní cystatiny byly získány expresí v bakterii *Escherichia coli*. Použité cystatiny byly připraveny a laskavě poskytnuty Dr. Kotsyfakisem.

3.2. METODY

3.2.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA CYTOTOXICKOU AKTIVITU NK BUNĚK *IN VITRO*

Vliv klíštěcích slin na aktivitu NK buněk byl zjišťován pomocí cytotoxického testu, ve kterém jako efekторы figurovaly NK buňky z myši sleziny a jako cíle byly použity YAC-1 buňky. Efekторы a cíle byly rozkapány na 96jamkovou kultivační destičku se dnem ve tvaru „U“ a rozděleny do několika různých skupin. Tyto skupiny zahrnovaly jamky s efektorovými a cílovými buňkami ve třech různých poměrech (100 : 1, 10 : 1 a 1 : 1) a dále jamky, které obsahovaly buď pouze cíle, nebo pouze efekторы a byly použity při výpočtech specifické cytotoxicity.

Do poloviny jamek s jednotlivými poměry a kontrolami byly přidány klíštěcí sliny a po 4 hodinách inkubace byla stanovena cytotoxická aktivita NK buněk vůči cílům v jednotlivých jamkách.

Pro určení aktivity NK buněk byly použity dva odlišné druhy testů – Ziva™ Tox Ultrasensitive Cytotoxicity Assay a značení cílových buněk radioaktivním izotopem ⁵¹Cr.

Všechny pokusy byly prováděny v triplikacích.

3.2.1.1. Izolace NK buněk

Myši, která byla v pokusu použita, byla 20 h před samotným pokusem intraperitoneálně injikována poly (I : C) (100 μg v 0,5 ml PBS) (Sigma). Druhý den byla myš usmrcena zlomením vazy a byla jí sterilně vyjmuta slezina. Ta byla pomocí tloučku protlačena přes sítko, jež bylo následně promyto základním médiem RPMI 1640 (Biosera). Tím vznikla buněčná suspenze ze slezinných buněk, která byla následně stočena v centrifuze po dobu 7 minut, při 150×g a teplotě 4°C.

Vzniklý supernatant byl opatrně slit a pelet byl rozsuspendován v 1 ml lyzačního roztoku (0,84% NH₄Cl), aby došlo k lýze erytrocytů. Po 2 minutách působení lyzačního roztoku bylo přilito základní médium a splenocyty byly dvakrát promyty po dobu 7 minut při 155 × g a 4 °C. Vzniklý pelet byl následně rozsuspendován v 1ml kultivačního média

(RPMI, 10 % BOFES, 1 % ATB, 0,1 % ME, 1 % GL) (Biosera). V Bürkerově komůrce byl spočítán počet buněk v 1 ml a splenocyty byly v požadovaném množství naředěny do kultivačního média.

3.2.1.2. Preinkubace se slinami

Splenocyty byly pipetovány na 96jamkovou kultivační destičku se dnem ve tvaru „U“ (Thermo Scientific™ Nunc™) v objemu 100 µl na jamku. Výsledná koncentrace buněk se v jednotlivých skupinách lišila dle různých poměrů efektorů a cílů. Pro poměr 100 : 1 byla výsledná koncentrace splenocytů 1×10^7 buněk na 1 ml, pro poměr 10:1 to bylo 1×10^6 buněk na 1 ml a pro poměr 1:1 byla výsledná koncentrace 1×10^5 buněk na 1 ml. Skupina, ke které nebyly později přidány žádné cílové buňky, obsahovala 1×10^7 buněk na 1 ml.

Takto připravené splenocyty byly rozděleny na dvě poloviny, přičemž k první polovině splenocytů byly přidány klišťecí sliny ve výsledné koncentraci proteinu 2 µg na jamku (tj. 20 µg/ml) a k druhé polovině splenocytů, která představovala srovnávací skupinu, bylo místo slin přidáno stejné množství kultivačního média.

Kultivační destička byla inkubována po dobu 1 hodiny, při 37°C a 5 % CO₂.

3.2.1.3. Vlastní cytotoxický test

Po uplynutí doby inkubace byly ke splenocytům přidány cílové buňky v objemu 100 µl na jamku. Ke kontrolní skupině splenocytů bylo namísto cílových buněk pipetováno pouze 100 µl kultivačního média. Na kultivační destičku byla rovněž pipetována kontrolní skupina samotných cílových buněk, ke které bylo také přidáno 100 µl kultivačního média. Výsledná koncentrace cílových buněk byla ve všech jamkách stejná a to 1×10^5 buněk na 1 ml.

V případě měření cytotoxické aktivity pomocí značení cílových buněk radioaktivním izotopem ⁵¹Cr byla navíc zařazena skupina samotných cílových buněk, ke kterým bylo přidáno 80 µl kultivačního média. Tato skupina byla zařazena i při použití Ziva-Tox kitu, ale bylo k ní navíc přidáno 20 µl 1% roztoku azidu sodného v PBS.

Ke skupinám, ke kterým byly před hodinovou inkubací pipetovány klišťecí sliny, byly sliny znovu přidány a to v takovém množství, aby byla výsledná koncentrace proteinu v jamkách rovna 20 µg/ml. Klišťecí sliny byly rovněž přidány k polovině samotných cílových buněk s médiem ve stejné výsledné koncentraci 20 µg/ml. Do ostatních jamek bylo opět místo slin přidáno stejné množství kultivačního média.

Kultivační destička byla centrifugována po dobu 3 minut, při $130 \times g$ a teplotě 4°C a byla inkubována 4 hodiny při 37°C a 5% CO_2 .

3.2.1.4. Měření cytotoxické aktivity NK buněk

ZivaTM Tox Ultrasensitive Cytotoxicity Assay (Ziva-Tox)

Ziva-Tox (Jaden BioScience Inc.) je velmi citlivý cytotoxický test založený na ELISA metodě, který využívá chemiluminiscenční substrát pro detekci přítomnosti bromdeoxyuridinu (BrdU) inkorporovaného do DNA aktivně se dělících buněk. Pomocí tohoto testu je možné stanovit specifickou procentuální cytotoxicitu, která určuje, do jaké míry došlo k inhibici syntézy DNA cílových buněk po přidání efektorových buněk. Toho je docíleno při srovnání množství BrdU inkorporovaného do DNA cílových buněk v přítomnosti a nepřítomnosti efektorů.

Při použití Ziva-Tox kitu bylo před stočením a následnou 4hodinovou inkubací přidáno do každé jamky $20 \mu\text{l}$ naředěného BrdU (součást Ziva-Tox kitu) a po uplynulé době inkubace byla kultivační destička centrifugována po dobu 5 minut, při $130 \times g$ a teplotě 4°C . Poté byl supernatant slit a do každé jamky bylo přidáno $50 \mu\text{l}$ Fix Solution (Ziva-Tox kit), ve kterém byly pelety stočených buněk rozsuspendovány a ihned přeneseny do 96jamkového bílého panelu s plochým dnem (Costar[®]). Panel byl ponechán 10 minut při laboratorní teplotě. Během této doby došlo působením Fix Solution k lýze buněk a navázání jejich DNA na dno jamek. Obsah jamek byl poté slit a do každé jamky bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ Stringency Solution (Ziva-Tox kit). Panel byl opět ponechán inkubovat po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a následně slit. Poté bylo do každé jamky přidáno $350 \mu\text{l}$ Preparation Solution (Ziva-Tox kit), a po dvou minutách při teplotě místnosti byl obsah jamek slit.

Po promytí bylo do každé jamky přidáno $50 \mu\text{l}$ anti-BrdU Antibody Conjugate Solution (Ziva-Tox kit), který obsahoval protilátku proti BrdU. Panel byl inkubován po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Během této doby došlo k navázání protilátky na BrdU, jenž byl začleněn v DNA, která byla zafixována na dně jamek.

Po uplynutí doby inkubace s protilátkou následovaly promývací kroky, jejichž účelem bylo odmytí volné či nespecificky navázané protilátky. Panel byl pětkrát promyt $300 \mu\text{l}$ Wash Buffer (Ziva-Tox kit) a třikrát $300 \mu\text{l}$ Preparation Solution (uváděné množství je pro jednu jamku na jedno promytí).

Následně bylo do každé jamky přidáno 50 μ l CDP- Star[®] Chemiluminiscent Substrate (Ziva-Tox kit) a po 30 minutách inkubace, během níž byl panel umístěn ve tmě při laboratorní teplotě, byl změřen chemiluminiscenční signál pro každou jamku.

Měření bylo prováděno na přístroji Synergy[™] H1 Microplate Reader (BioTek[®]) a výsledná cytotoxicita byla spočtena pomocí následujícího vzorce:

$$\text{Specifická procentuální cytotoxicita} = 1 - \left(\frac{\text{RLU}_{\text{exp}} - \text{RLU}_{\text{spont}} - \text{RLU}_{\text{eff}}}{\text{RLU}_{\text{max}} - \text{RLU}_{\text{spont}} - \text{RLU}_{\text{eff}}} \right) \times 100 [\%]$$

Kde: RLU_{exp} = hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících cílové a efektorové buňky v různých poměrech.

$\text{RLU}_{\text{spont}}$ = hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících cílové buňky s přidáním azidem sodným (ve výsledné koncentraci 0,1 % zcela inhibuje syntézu DNA cílových buněk). Tato skupina představuje nejmenší možné množství BrdU, které se začlení do DNA cílových buněk.

RLU_{max} = hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících pouze cílové buňky. Tato skupina představuje maximální množství BrdU, které se začlení do DNA cílových buněk.

RLU_{eff} = hodnota naměřeného signálu v jamkách obsahujících pouze efektorové buňky.

Měření množství uvolněného ⁵¹Cr

Tento test je založen na značení cílových buněk radioaktivním izotopem chromu (⁵¹Cr), který se v průběhu růstu buněk váže na proteiny v jejich cytoplazmě. Značené buňky jsou použity pro cytotoxický test a v případě, že dojde k cytolýze, uvolní se radioaktivní ⁵¹Cr, jež může být na základě záření, které při svém rozpadu emituje, detekován pomocí scintilačního počítače. Na základě měření množství uvolněného ⁵¹Cr lze poté stanovit míru specifické procentuální lýzy.

Před pipetováním na kultivační destičku musely tedy být cílové buňky nejprve označeny radioaktivním chromem a to následujícím způsobem:

Z kultivační lahvičky bylo odebráno takové množství YAC-1 buněk, které odpovídalo 1 miliónu buněk. Toto množství bylo centrifugováno po dobu 5 minut, při 110 \times g a pomocí mikropipety byl opatrně odsát vzniklý supernatant. Pelet byl rozsuspendován v 50 μ l

kultivačního média (RPMI, 10 % BOFES, 1 % ATB, 0,1 % ME, 1 % GL) (Biosera). K suspenzi bylo přidáno 50 μCi roztoku chromanu sodného ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (PerkinElmer) a buňky byly inkubovány 1 hodinu při 37°C.

Po inkubaci byl přidán 1 ml kultivačního média a suspenze byla centrifugována po dobu 3 minut při 110 \times g. Supernatant byl opatrně odsát mikropipetou a pelet byl rozsuspendován v 1 ml kultivačního média. Celý postup byl ještě dvakrát opakován za účelem odstranění nenavázaného ^{51}Cr . Poté bylo odebráno potřebné množství cílových buněk, které byly naředěny do média a pipetovány na kultivační destičku tak, jak je popsáno výše v bodu 3.2.1.3.

Po 4hodinové inkubaci při 37 °C v atmosféře s 5% CO_2 byla kultivační destička stočena po dobu 3 minut, při 130 \times g a teplotě 4°C. Do skupiny jamek označené TR (totální uvolnění ^{51}Cr), která obsahovala cílové buňky a pouze 80 μl média, bylo přidáno 20 μl 2% detergentu Triton X-100 (Serva). Z každé jamky bylo poté odebráno 30 μl supernatantu, jenž byl přenesen do jednotlivých mikrozkušavek, do kterých bylo předtím pipetováno 250 μl scintilačního roztoku (Ultima GoldTM) (PerkinElmer).

Vlastní měření bylo prováděno pomocí scintilačního počítače Tri-Carb® 2900TR Liquid Scintillation Analyzers (Packard), který měřil výsledný signál na základě β záření vznikajícího při rozpadu radioizotopu ^{51}Cr .

Výsledná cytotoxicita byla vyjádřena jako specifické procentuální uvolnění ^{51}Cr dle následujícího vzorce:

$$\text{Specifické procentuální uvolnění } ^{51}\text{Cr} = \left(\frac{\text{ER} - \text{SR}}{\text{TR} - \text{SR}} \right) \times 100 [\%]$$

Kde: ER = experimentální uvolnění ^{51}Cr , tj. hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících cílové a efektorové buňky.

SR = spontánní uvolnění ^{51}Cr , tj. hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících pouze cílové buňky.

TR = totální uvolnění ^{51}Cr , tj. hodnota signálu naměřeného v jamkách obsahujících pouze cílové buňky s přidaným detergentem.

3.2.2. VLIV KLÍŠTĚCÍCH CYSTATINŮ NA CYTOTOXICKOU AKTIVITU NK BUNĚK *IN VITRO*

Uspořádání pokusu bylo totožné s výše popsáným pokusem (viz 3.2.1), ale místo klíštěcích slin byly použity rekombinantní cystatiny X1, X2 a X3. V první sérii pokusů byly cystatiny použity pouze v jedné koncentraci a jejich výsledná koncentrace byla ve všech případech 6 μM . V dalších pokusech byly použity cystatiny ve třech různých výsledných koncentracích – 6 μM , 3 μM a 1,5 μM . Cystatiny byly stejně jako v případě slin preinkubovány s efektorovými buňkami po dobu 1 hodiny.

Pro pokusy byl použit pouze jeden poměr efektorů vůči cílům a to poměr 100 : 1.

Pokusy byly prováděny v triplicacích a stejně jako v předchozím pokusu byla zahrnuta kontrolní skupina obsahující pouze samotné cílové buňky a k nim přidáné cystatiny.

3.2.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu R (R Development Core Team 2008) metodou jednocestné analýzy variance (ANOVA). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($p < 0,05$) jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro $p < 0,05$, dvě pro $p < 0,01$).

Všechny grafy použité ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry z naměřených hodnot a chybové úsečky v grafech znázorňují střední chybu průměru (SEM).

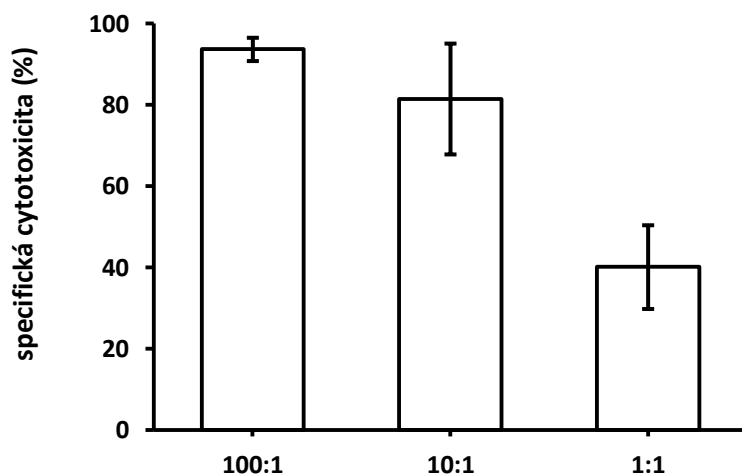
4. VÝSLEDKY

4.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA AKTIVITU NK BUNĚK

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda mají klíštěcí sliny inhibiční účinek na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.

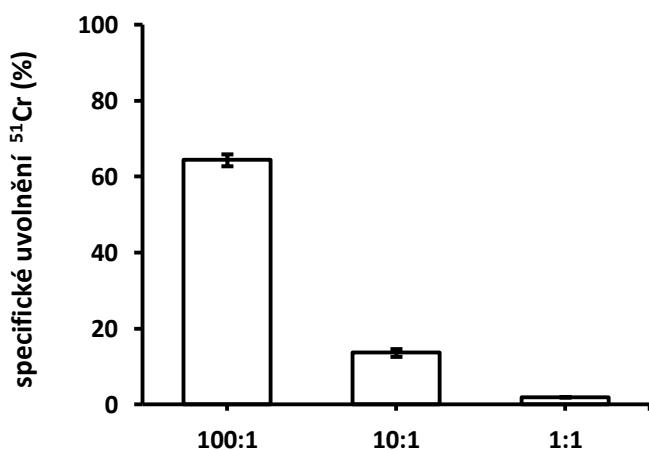
Před provedením samotného pokusu (viz bod 3.2.1. metodiky), bylo nejprve ověřeno, zda zvolená metoda správně funguje a efektorové NK buňky vykazují vůči cílovým YAC-1 buňkám určitou cytotoxickou aktivitu. Cytotoxicita byla sledována při třech různých poměrech efektorů a cílů (100:1, 10:1, 1:1) a byla stanovena pomocí dvou výše popsaných testů (viz 3.2.1.4.).

Při použití Ziva-Tox kitu byla u všech tří poměrů efektorů a cílů naměřena určitá míra specifické cytotoxicity (Obr. 1), jejíž hodnoty klesaly v závislosti na snižujícím se počtu efektorových buněk a to z 94 % specifické cytotoxicity pro poměr 100:1, na 81 % pro poměr 10:1 až na 40 % pro poměr 1:1.



Obr. 1: Specifická cytotoxická aktivita NK buněk stanovená pomocí Ziva-Tox kitu pro tři různé poměry efektorů a cílů (100:1, 10:1 a 1:1).

Shodný trend byl pozorován i při stanovení cytotoxické aktivity prostřednictvím množství uvolněného ^{51}Cr (Obr. 2) a určitá míra cytotoxicity byla opět zjištěna u všech tří poměrů. Pro poměr 100:1 bylo specifické uvolnění ^{51}Cr rovno 62 %, u poměru 10:1 pokleslo na 15 % a pro poměr 1:1 to byla pouze 2 %.

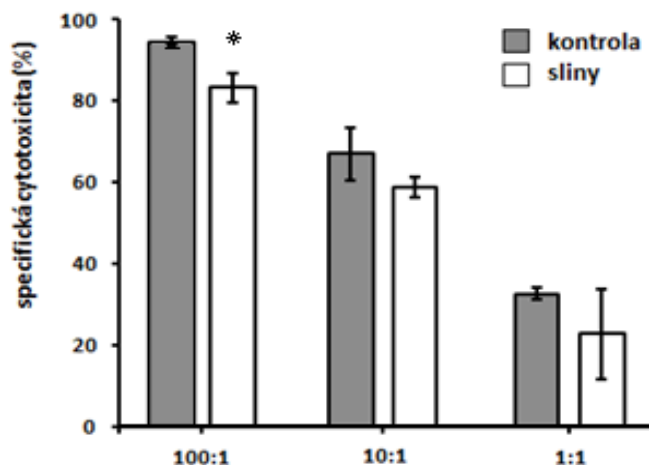


Obr. 2: Cytotoxická aktivita NK buněk vyjádřená pomocí specifického uvolnění ^{51}Cr pro tři různé poměry efektorů a cílů (100:1, 10:1 a 1:1).

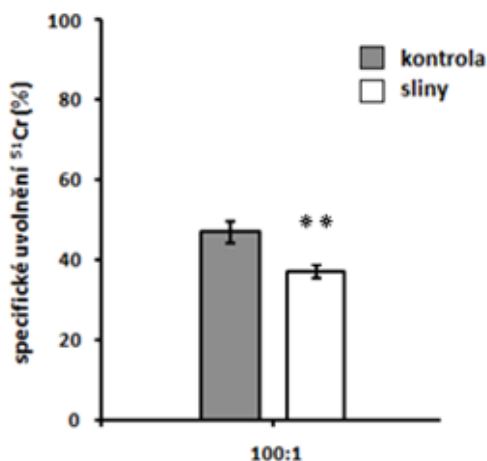
Po provedení pokusů ověřujících cytotoxickou aktivitu NK buněk vůči cílovým YAC-1 buňkám, byly provedeny vlastní pokusy s klíštěcími slinami.

Při použití Ziva-Tox kitu došlo u sledovaných skupin vlivem klíštěcích slin k poklesu specifické cytotoxicity při porovnání s kontrolou, kterou představovala skupina efektorů a cílů bez přidání klíštěcích slin (Obr. 3). Signifikantní pokles ($p < 0,05$) byl pozorován pro poměr 100:1 a činil 12 %. Pro poměr 10:1 byl zaznamenán trendový pokles rovněž 12 % a pro poměr 1:1 to bylo 30 %. Z důvodu velké variability hodnot v rámci triplikací však pokles nebyl v případě poměrů 10:1 a 1:1 signifikantní.

Při stanovení cytotoxicity prostřednictvím množství uvolněného ^{51}Cr byl ve skupinách s přidáním klíštěcími slinami pozorován vůči kontrole signifikantní pokles ($p < 0,01$) cytotoxické aktivity, a to o 21 % (Obr. 4).



Obr. 3: Vliv klíštěcích slin (výsledná koncentrace proteinu 20 µg/ml) na cytotoxickou aktivitu NK buněk při použití tří různých poměrů efektorů a cílů (tj. 100:1, 10:1 a 1:1); * $p < 0,05$.



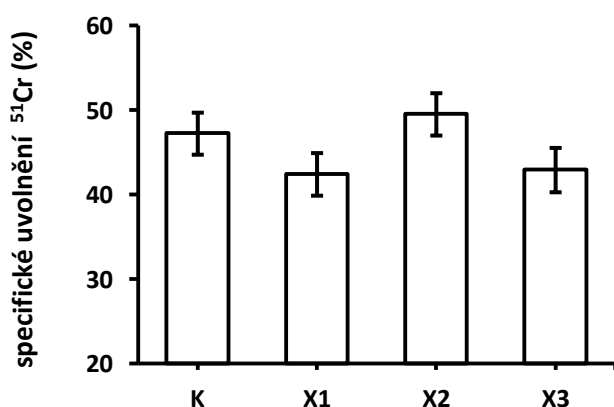
Obr. 4: Vliv klíštěcích slin (výsledná koncentrace proteinu 20 µg/ml) na cytotoxickou aktivitu NK buněk stanovenou pomocí specifického uvolnění ⁵¹Cr pro poměr efektorů a cílů 100:1; ** $p < 0,01$.

4.2. VLIV KLÍŠTĚCÍCH CYSTATINŮ NA AKTIVITU NK BUNĚK

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda mají použité rekombinantní cystatiny X1, X2 a X3 inhibiční účinek na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.

Při této sérii pokusů byl použit pouze jeden druh testu a to stanovení cytotoxicity pomocí specifického uvolnění ⁵¹Cr.

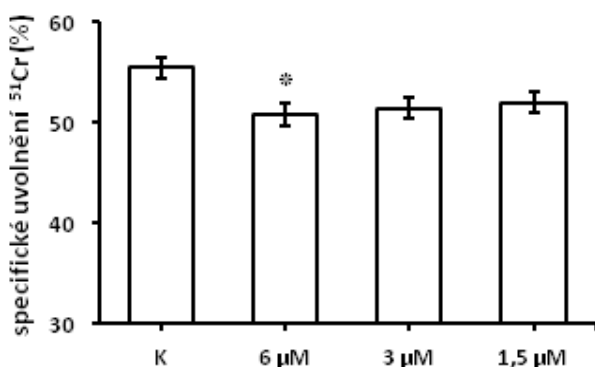
Přidání cystatinů ke skupinám zahrnujícím efektorů a cíle v poměru 100:1 mělo v případě proteinů X1 a X3 za následek trendový pokles hodnot specifického uvolnění ^{51}Cr v porovnání s kontrolou, která představovala skupinu efektorů a cílů bez přidanych cystatinů (Obr. 5). Vlivem cystatinu X2 nebyl pozorován žádný pokles.



Obr. 5: Vliv cystatinů X1, X2 a X3 (6 μM) na cytotoxickou aktivitu NK buněk vyjádřenou pomocí specifického uvolnění ^{51}Cr pro poměr efektorů a cílů 100:1; K = kontrola.

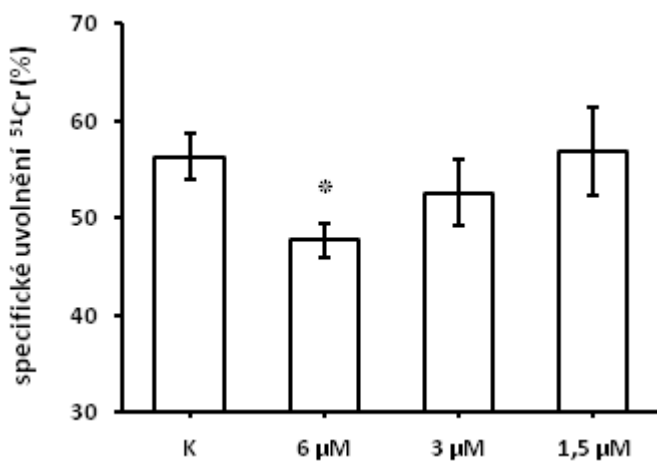
V návaznosti na tyto výsledky byly pokusy zopakovány pro různé výsledné koncentrace klíštěcích cystatinů X1 a X3.

Vlivem cystatinu X1 došlo v porovnání s kontrolou k signifikantnímu poklesu ($p < 0,05$) hodnot specifického uvolnění ^{51}Cr v případě nejvyšší použité koncentrace (tj. 6 μM), a to o 9 % (Obr. 6). V případě nižších koncentrací proteinu byl pozorován shodný trend (snížení o 8 % pro 3 μM a 5 % pro 1,5 μM), pokles však nebyl signifikantní.



Obr. 6: Vliv proteinu X1 ve třech různých koncentracích na cytotoxickou aktivitu NK buněk vyjádřenou pomocí specifického uvolnění ^{51}Cr pro poměr efektorů a cílů 100:1; K = kontrola, * $p < 0,05$.

Vlivem proteinu X3 došlo v případě nejvyšší použité výsledné koncentrace (6 μM) k signifikantnímu poklesu ($p < 0,05$) hodnot specifického uvolnění ^{51}Cr vůči kontrole, a to o 14 % (Obr. 7). V případě 3 μM koncentrace proteinu byl pozorován shodný trendový pokles o 7 %, který však nebyl signifikantní. U nejnižší použité koncentrace (1,5 μM) nebyl pozorován žádný pokles.



Obr. 7: Vliv proteinu X3 ve třech různých koncentracích na cytotoxickou aktivitu NK buněk vyjádřenou pomocí specifického uvolnění ^{51}Cr pro poměr efektorů a cílů 100:1; K = kontrola, * $p < 0,05$.

5. DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda mají klišťecí sliny z *I. ricinus* a určité proteiny obsažené v těchto slinách vliv na aktivitu NK buněk, které díky svým cytotoxickým schopnostem představují důležitý nástroj přirozené imunity.

Prostřednictvím provedených pokusů se podařilo prokázat jasný inhibiční účinek na cytotoxickou aktivitu NK buněk a to jak v případě klišťecích slin, tak i v případě dvou ze tří použitých proteinů, které byly izolované ze slin klišťete *I. ricinus* a spadají do skupiny inhibitorů cysteinových proteáz (cystatinů).

U klišťecích slin byl inhibiční efekt prokázán za použití dvou odlišných testů pro stanovení cytotoxické aktivity. Je třeba zdůraznit, že vypočítané hodnoty specifické procentuální cytotoxicity jsou pro každý test odlišné, neboť každý z použitých testů je založen na jiném principu. Ziva-Tox využívá pro stanovení cytotoxické aktivity efektorových buněk inhibici syntézy DNA cílových buněk, která nastává poté, co cílové buňky přijdou do kontaktu s efektorovými buňkami. Naopak test s použitím radioizotopu ^{51}Cr je založen na měření množství ^{51}Cr , které se uvolní ze značených cílových buněk po jejich lýze zprostředkované efektorovými buňkami.

Je také nutno dodat, že výsledky získané po stanovení cytotoxické aktivity pomocí Ziva-Tox kitu nemají takovou vypovídací hodnotu, jako výsledky obdržené při měření specifického uvolnění ^{51}Cr . Důvodem je fakt, že hodnoty specifické cytotoxicity stanovené pomocí Ziva-Tox kitu vykazovaly v rámci triplicací značnou variabilitu, kterou se ani několikerým opakováním pokusů a konzultací s výrobcem kitu nepodařilo zcela objasnit a vyvarovat se jí v příštích pokusech. Také proto byl zvolen jiný typ testu, jenž by ověřil výsledky získané při použití Ziva-Tox kitu, které mohly být variabilitou hodnot zkreslené. Ve finále výsledky obou testů vypovídaly o signifikantním poklesu cytotoxické aktivity NK buněk po přidání klišťecích slin, ale v případě použití ^{51}Cr byl pokles pozorován ve větší míře (pokles o 21 % vůči kontrole) než u Ziva-Tox kitu (pokles pouze o 12 %) (pro poměr efektorových a cílových buněk roven 100:1).

Při posuzování vlivu klišťecích cystatinů byl u dvou použitých rekombinantních cystatinů pozorován signifikantní inhibiční efekt na cytotoxickou aktivitu NK buněk. Efekt vyvolaný klišťecími cystatiny byl v porovnání s působením klišťecích slin o poznání nižší, což by mohlo vypovídat o redundantním účinku klišťecích slin, tzn., že ovlivnění určité

složky imunitní odpovědi nejspíš nebude způsobeno pouze jedním typem molekul, ale bude k němu docházet spíše spoluúčastí několika různých látek obsažených v klíštěcích slinách.

Vliv klíštěcích slin a cystatinů na imunitu hostitele byl předmětem zájmu několika studií, málo z nich se však věnuje působení klíštěcích slin a cystatinů na aktivitu NK buněk. Ty přitom představují důležitou součást přirozené imunity a jsou to právě složky přirozené (nespecifické) imunity, které hrají důležitou roli v obraně proti klíšťatům v prvních dnech po jejich přisátí na hostitele. V místě přisátí klíštěte se velmi rychle aktivují mnohé buňky přirozené imunity, jako jsou např. neutrofilů, dendritické buňky, makrofágy či NK buňky, a dochází ke vzniku zánětu (Wikel, 2013). Klíště se této odezvě ze strany hostitelského organismu pochopitelně snaží bránit a vyvinulo si řadu mechanismů, jak snížit riziko, které pro něj imunitní reakce hostitele představuje. Tyto mechanismy jsou zprostředkovávány prostřednictvím klíštěcích slin a byly popsány a detailně shrnuty v mnoha pracích (např. Anderson & Valenzuela, 2008; Francischetti et al., 2009; Kazimírová & Štibrániová, 2013; Wikel, 2013).

Je např. známo, že sliny z klíštěte *I. scapularis* mají inhibiční efekt na schopnost fagocytózy a zabíjení neutrofilů (Ribeiro et al., 1990), působením slin či SGE mnoha druhů klíšťat dochází k inhibici aktivace alternativní cesty komplementu (Ribeiro, 1987; Lawrie et al., 1999), byl zaznamenán protizánětlivý účinek SGE z klíštěte *I. ricinus* při infekci bakterií *Borrelia afzelii* (Severinová et al., 2005). Rovněž byl velmi dobře popsán vliv klíštěcí slin na diferenciaci, maturaci a migraci dendritických buněk (Cavassani et al., 2005; Skallová et al., 2008; Oliveira et al., 2008) a schopnost určitých molekul obsažených v klíštěcích slinách redukovat vylučování některých cytokinů dendritickými buňkami (Sá-Nunes et al., 2007; Preston et al., 2013). Na druhou stranu, jak již bylo uvedeno výše, existuje jen málo studií, které se věnují účinku klíštěcích slin či SGE na NK buňky.

Kubeš et al. (1994) ve své práci demonstrovali inhibiční efekt SGE z klíštěte *Dermacentor reticulatus* na aktivitu nestimulovaných lidských NK buněk. O několik let později byl proveden podobný experiment, ale tentokrát byly navíc použity SGE z různých druhů klíšťat (Kubeš et al., 2002). Překvapivým zjištěním byl fakt, že při použití SGE z klíštěte *I. ricinus* nebyl zaznamenán žádný vliv na aktivitu NK buněk. Tento výsledek byl v kontrastu s výsledky dřívější práce Kopeckého & Kuthejlové (1998), ve které byl inhibiční efekt SGE z klíštěte *I. ricinus* na aktivitu NK buněk jasně prokázán, s tím rozdílem, že pro pokus nebyly použity lidské NK buňky, ale NK buňky izolované z myši sleziny. Inhibice NK aktivity byla v tomto případě pozorována jak u nestimulovaných buněk, tak i u buněk

stimulovaných *in vivo* pomocí poly (I:C). Výsledky mé práce, v níž byly místo SGE používány klíštěcích sliny, se shodují s výsledky práce Kopeckého & Kuthejlové (1998).

Výsledky získané po použití klíštěcích cystatinů nelze porovnat s žádnou prací, neboť se doposud žádná studie nevěnovala vlivu klíštěcích cystatinů na aktivitu NK buněk. Existuje však řada prací, které se zabývají účinkem cystatinů z klíštěcích slin na jiné složky přirozené imunity. Dobře popsány jsou např. inhibiční účinky sialostatinu L z klíštěte *I. scapularis* na maturaci dendritických buněk a na migraci neutrofilů během akutní fáze zánětu (Kotsyfakis et al., 2006; Sá-Nunes et al., 2009). U podobného cystatinu ze stejného druhu klíštěte, u sialostatinu L2, byl popsán protizánětlivý účinek při infekci bakterií *Anaplasma phagocytophilum* (Chen et al., 2014) a také byl zjištěn jeho inhibiční efekt na signalizaci prostřednictvím IFN typu I u dendritických buněk (Lieskovská et al., 2015).

V této práci bylo zjištěno, že vlivem klíštěcích slin a cystatinů dochází k inhibici cytotoxické aktivity NK buněk, ale přesný způsob, jakým k tomu dochází, není dosud objasněn. Nelze ani s jistotou uvést důvod, proč vlivem klíštěcích slin a molekul v nich obsažených dochází ze stran klíštěte k inhibici aktivity NK buněk. Přímý účinek NK buněk na klíště samotné nebyl zatím nijak prokázán a je i velmi nepravděpodobné, že by k něčemu takovému docházelo.

Na druhou stranu je nutno vzít v úvahu fakt, že NK buňky nemají pouze funkci efektorů schopných prostřednictvím cytolýzy likvidovat nádorové a virem napadené buňky, ale plní i důležitou funkci jakožto regulační buňky, které ovlivňují činnost ostatních imunitních buněk, jako jsou např. dendritické buňky, makrofágy či T-lymfocyty (Vivier et al., 2011). NK buňky představují významný zdroj mnoha cytokinů (např. TNF- α , IFN- γ), z nichž některé mají buď přímý prozánětlivý účinek, nebo aktivují další složky imunitního systému, které se na vzniku zánětu podílejí. Některé cytokiny (např. IFN- γ) jsou zase důležité pro vznik a vývoj adaptivní (specifické) imunity (Walzer et al., 2005; Vivier et al., 2011).

Potlačení aktivity NK buněk by mohlo tedy vést k utlumení prozánětlivé reakce a schopnosti složek přirozené imunity formovat imunitu adaptivní (specifickou), které by jinak mohly klíštěti znemožňovat úspěšné dokončení procesu sání. Především vznik zánětu hraje důležitou roli při rejekci klíštěte (Wikel, 2013).

Na závěr je možno také zmínit, že inhibice cytotoxických schopností NK buněk likvidovat virem napadené buňky by mohla hrát určitou roli při tzv. slinami aktivovaném přenosu (SAT). Tento způsob přenosu, využívající oslabení obranných mechanismů hostitele

prostřednictvím molekul obsažených v klíštěcích slinách, byl pozorován u mnoha patogenů přenášených klíšťaty (Jones et al., 1989, 1990; Zeidner et al., 2002) včetně přenosu viru klíšťové encefalitidy u klíštěte *I. ricinus* (Labuda et al., 1993a). K přenosu tohoto viru do hostitelského organismu dochází záhy po přisátí klíštěte (Alekseev & Chunikhin, 1989) a bylo prokázáno, že NK buňky figurují při rozpoznávání a likvidaci buněk infikovaných virem klíšťové encefalitidy (Vargin & Semenov, 1986). Z tohoto hlediska by tedy mohla inhibice cytotoxické aktivity NK buněk hrát určitou roli při přenosu viru klíšťové encefalitidy.

6. ZÁVĚR

- Sliny z klíštěte *I. ricinus* vykazují inhibiční efekt na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.
- Klíštěcí cystatiny X1 a X3 mají inhibiční efekt na cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*.
- Klíštěcí cystatin X2 nemá na aktivitu NK buněk žádný vliv.

7. SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotika
BrdU	bromdeoxyuridin, synteticky vyrobený analog thymidinu
BOFES	bovinní fetální sérum
CNS	centrální nervová soustava
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	angl. enzyme-linked immunosorbent assay
GL	L-glutamin
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
ME	2-merkaptóetanol
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
NK	přirozený zabíječ (angl. natural killer)
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok
Poly (I:C)	farmakologický analog dsRNA (angl. polyinosinic-polycytidylic acid)
SAT	slinami aktivovaný přenos (angl. saliva-activated transmission)
SGE	extrakt ze slinných žláz (angl. salivary gland extract)
TNF	faktor nádorové nekrózy (angl. tumor necrosis factor)
VKE	virus klíšťové encefalitidy

8. SEZNAM LITERATURY

Alekseev, A. N., Chunikhin, S. P. (1989). The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences); *Parazitologiya*, 24, 177-185.

Anderson, J. M., Valenzuela, J. G. (2008). Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics; *Ticks: biology, disease and control*, eds A. S. Bowman and P. A. Nuttall (Cambridge: Cambridge University Press), 92-107.

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., et al. (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation; *Immunity*, 16, 849-859.

Bancroft, G. J. (1993). The role of natural killer cells in innate resistance to infection; *Current Opinion in Immunology*, 5, 503-510.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA; *Science*, 285, 727-729.

Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., et al. (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function; *PloS One*, 3, e3987.

Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines; *Annual Review of Immunology*, 17, 189-220.

Bowman, A. S., Ball, A., Sauer, J. R. (2008). Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission; *Ticks: biology, disease and control*, eds A. S. Bowman and P. A. Nuttall (Cambridge: Cambridge University Press), 73-91.

Bowman, A. S., Sauer, J. R. (2004). Tick salivary glands: function, physiology and future; *Parasitology*, 129, 67-81.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Calisher, C. H.** (1988). Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis; *Acta Virologica*, 32, 469-478.
- Campbell, K. S., & Hasegawa, J.** (2013). Natural killer cell biology: an update and future directions; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132, 536-544.
- 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.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A.** (2001). The biology of human natural killer-cell subsets; *Trends in Immunology*, 22, 633-640.
- Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., Fikrig, E.** (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent; *PLoS Pathogens*, 6, e1001205.
- Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J. P., Chiappino, I. et al.** (2007). Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins; *Insect Molecular Biology*, 16, 155-166.
- Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S. et al.** (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis; *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 2381-2395.
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A. L., Dias, J. M., Coelho, F. M. et al.** (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity; *The Journal of Experimental Medicine*, 205, 2019-2031.
- 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.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J.** (1999). Tick-borne encephalitis; *Clinical Infectious Diseases*, 28, 882-890.

- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., Heinz, F. X.** (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia; *Journal of General Virology*, 80, 179-185.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., Walczak, H.** (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1462-1475.
- Ferreira, B. R., Silva, J. S.** (1999). Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice; *Immunology*, 96, 434-439.
- Francischetti, I. M.** (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals; *Toxicon*, 56, 1130-1144.
- Francischetti, I. M., Sá-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M.** (2009). The role of saliva in tick feeding; *Frontiers in Bioscience*, 14, 2051.
- Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.** (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex; *Blood*, 99, 3602–3612.
- Frauenschuh, A., Power, C. A., Déruaz, M., Ferreira, B. R., Silva, et al.** (2007). Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 27250-27258.
- 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.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., et al.** (2007). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy; *Virology*, 361, 80-92.
- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T.** (2007). The trafficking of natural killer cells; *Immunological Reviews*, 220, 169-182.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A.** (2003). Tick-borne encephalitis; *Antiviral Research*, 57, 129-146.

- Haglund, M., Günther, G.** (2003). Tick-borne encephalitis - pathogenesis, clinical course and long-term follow-up; *Vaccine*, 21, S11-S18.
- Hajnická, V., Kocáková, P., Sláviková, M., Slovák, M., Gašperík, J., Fuchsberger, N., Nuttall, P. A.** (2001). Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts; *Parasite Immunology*, 23, 483-489.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., Bowman, A. S.** (2004). Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission; *Immunology*, 113, 401-408.
- Hayakawa, Y., Smyth, M. J.** (2006). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity; *The Journal of Immunology*, 176, 1517-1524.
- Holzmann, H.** (2003). Diagnosis of tick-borne encephalitis; *Vaccine*, 21, S36-S40.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., Rice, C. M.** (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication; *Annual Reviews in Microbiology*, 44, 649-688.
- Chen, G., Wang, X., Severo, M. S., Sakhon, O. S., Sohail, M., et al.** (2014). The tick salivary protein sialostatin L2 inhibits caspase-1-mediated inflammation during *Anaplasma phagocytophilum* infection; *Infection and Immunity*, 82, 2553-2564.
- Chmelař, J., Oliveira, C. J., Řezáčová, P., Francischetti, I. M., Kovářová, Z. et al.** (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation; *Blood*, 117, 736-744.
- Ibrahim, M. A., Ghazy, A. H. M., Maharem, T. M., Khalil, M. I.** (2001). Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii*; *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130, 501-512.
- Jaenson, T. G., Tälleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J., Mejlom, H.** (1994). Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden; *Journal of Medical Entomology*, 31, 240-256.

- Jones, L. D., Davies, C. R., Williams, T., Cory, J., Nuttall, P. A.** (1990). 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.
- Jones, L. D., Hodgson, E., Nuttall, P. A.** (1989). Enhancement of virus transmission by tick salivary glands; *Journal of General Virology*, 70, 1895-1898.
- Kaufman, W. R.** (1991). Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch; *Journal of Insect Physiology*, 37, 95-99.
- Kaufman, W. R., Phillips, J. E.** (1973). Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. Routes of ion and water excretion; *Journal of Experimental Biology*, 58, 523-536.
- Kazimírová, M., Štibrániová, I.** (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission; *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43.
- Kemp, D. H., & Tatchell, R. J.** (1971). The mechanism of feeding and salivation in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887); *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 37, 55-69.
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.** (1975). „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype; *European Journal of Immunology*, 5, 112-117.
- Koh, C. Y., Kini, R. M.** (2009). Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals; *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 102, 437-453.
- Kopecký, J., Kuthejlová, M.** (1998). Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro; *Parasite Immunology*, 20, 169-174.
- 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.

- 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*; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29256-29263.
- Kotsyfakis, M., Sá-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*; *Journal of Biological Chemistry*, 281, 26298-26307.
- Krantz, G. W., Walter, D. E. (Eds.)** (2009). *A Manual of Acarology* (3rd ed). Texas Tech University Press, Lubbock, Tex.
- Krzewski, K., Coligan, J. E.** (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis; *Frontiers in Immunology*, 3, 335.
- Kubeš, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Žuffová, E., Nuttall, P. A.** (1994). Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro; *Immunology*, 82, 113.
- Kubeš, M., Kocáková, P., Slovák, M., Sláviková, M., Fuchsberger, N., Nuttall, P. A.** (2002). Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity; *Parasite Immunology*, 24, 23-28.
- Kuno, G., Chang, G. J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., Cropp, C. B.** (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus; *Journal of Virology*, 72, 73-83.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Nuttall, P. A.** (1993a). Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts; *Medical and Veterinary Entomology*, 7, 193-196.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P. A.** (1993b). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks; *Journal of Medical Entomology*, 30, 295-299.
- Labuda, M., Nuttall, P. A., Kožuch, O., Elečková, E., Williams, T., Žuffová, E., Sabo, A.** (1993c). Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature; *Experientia*, 49, 802-805.
- Lanier, L. L.** (1998). NK cell receptors; *Annual Review of Immunology*, 16, 359-393.

- Lanier, L. L.** (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition; *Nature Immunology*, 9, 495-502.
- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J., Phillips, J. H.** (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes; *Immunology*, 141, 3478-3485.
- Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A.** (1999). *Ixodes* ticks: Serum species sensitivity of anti-complement activity; *Experimental Parasitology*, 93, 207–214.
- 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; *Journal of Biological Chemistry*, 277, 10083-10089.
- Lieskovská, J., Páleníková, J., Širmarová, J., Elsterová, J., Kotsyfakis, M., et al.** (2015). Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells; *Parasite Immunology*, 37, 70-78.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M.** (2003). Molecular biology of flaviviruses; *Advances in Virus Research*, 59, 23-61.
- Lindquist, L., Vapalahti, O.** (2008). Tick-borne encephalitis; *The Lancet*, 371, 1861-1871.
- Ljunggren, H. G., Kärre, K.** (1990). In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition; *Immunology Today*, 11, 237-244.
- Mans, B. J.** (2010). Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods; *Journal of Innate Immunity*, 3, 41-51.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., Solomon, T.** (2009). Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis; *Journal of General Virology*, 90, 1781-1794.
- MacFarlane, A. W., Campbell, K. S.** (2006). Signal transduction in natural killer cells; *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 298, 23-57.
- Málková, D., Fraňková, V.** (1959). The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice; *Acta Virologica*, 3, 210.
- Marçais, A., Viel, S., Grau, M., Henry, T., Marvel, J., Walzer, T.** (2013). Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines; *Frontiers in Immunology*, 4, 450.

- McSwain, J. L., Essenberg, R. C., Sauer, J. R.** (1982). Protein changes in the salivary glands of the female lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding; *Journal of Parasitology*, 68, 100-106.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C. et al.** (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity; *Annual Review of Immunology*, 19, 197-223.
- Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig, E.** (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*; *Insect Molecular Biology*, 11, 641–650.
- Nava, S., Guglielmo, A.A., Mangold, A.J.** (2009). An overview of systematics and evolution of ticks; *Frontiers in Bioscience*, 14, 2857-2877.
- Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., Nuttall, P. A.** (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*; *Journal of Immunology*, 174, 2084-2091.
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., Kaufman, W. R.** (1994). Adaptations of arboviruses to ticks; *Journal of Medical Entomology*, 31, 1-9.
- Nuttall, P. A., Labuda, M.** (2004). Tick–host interactions: saliva-activated transmission; *Parasitology*, 129, 177-189.
- Oliveira, C. J. F., Cavassani, K. A., Moré, D. D., Garlet, G. P., Aliberti, J. C., Silva, J. S., Ferreira, B. R.** (2008). Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5; *International Journal for Parasitology*, 38, 705-716.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Nuttall, P. A., Stuart, D. L.** (2000). Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482, 92-101.
- Páleníková, J., Lieskovská, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Chmelař, J., Kopecký, J.** (2015). *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of IL-6/STAT-3 signalling pathway; *Infection and Immunity*, IAI-03065.

- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R. et al.** (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells; *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 1505-1516.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L. et al.** (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity; *The Journal of Experimental Medicine*, 188, 953-960.
- Preston, S. G., Majtán, J., Kouremenou, C., Rysnik, O., Burger, L. F. et al.** (2013). Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses; *PLoS Pathogens*, 9, e1003450.
- R Development Core Team** (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F. et al.** (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host; *Nature*, 436, 573-577.
- Ribeiro, J. C.** (1987). *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity; *Experimental Parasitology*, 64, 347-353.
- Ribeiro, J. C., Evans, P. M., MacSwain, J. L., Sauer, J.** (1992). *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E₂ and F_{2α} by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry; *Experimental Parasitology*, 74, 112-116.
- Ribeiro, J. C., Weis, J. J., Telford, S. R.** (1990). Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function; *Experimental Parasitology*, 70, 382-388.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Robinson, D. R.** (1988). *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion; *Journal of Parasitology*, 74, 1068-1069.
- Ribeiro, J. M., Mather, T. N.** (1998). *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase; *Experimental Parasitology*, 89, 213-221.
- Růžek, D., Dobler, G., Mantke, O. D.** (2010). Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications; *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 223-232.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M. et al.** (2009). The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity; *The Journal of Immunology*, 182, 7422-7429.

- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. et al.** (2007). Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva; *The Journal of Immunology*, 179, 1497-1505.
- Sauer, J. R., Essenberg, R. C., Bowman, A. S.** (2000). Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion; *Journal of Insect Physiology*, 46, 1069-1078.
- Sauer, J. R., McSwain, J. L., Bowman, A. S., Essenberg, R. C.** (1995). Tick salivary gland physiology; *Annual Review of Entomology*, 40, 245-267.
- Screpanti, V., Wallin, R. P., Ljunggren, H. G., Grandien, A.** (2001). A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells; *The Journal of Immunology*, 167, 2068-2073.
- Seliger, B., Ritz, U., Soldano, F.** (2006). Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation; *International Journal of Cancer*, 118, 129-138.
- Severinová, J., Salát, J., Kročová, Z., Řezníčková, J., Demová, H., Horká, H., Kopecký, J.** (2005). Co-inoculation of *Borrelia afzelii* with tick salivary gland extract influences distribution of immunocompetent cells in the skin and lymph nodes of mice; *Folia Microbiologica*, 50, 457-463.
- Shipley, M. M., Dillwith, J. W., Bowman, A. S., Essenberg, R. C., Sauer, J. R.** (1993). Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding; *Journal of Parasitology*, 79, 834-842.
- Schmelz, M.** (2010). Itch and pain; *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34, 171-176.
- 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.
- Schwarz, A., Valdés, J. J., Kotsyfakis, M.** (2012). The role of cystatins in tick physiology and blood feeding; *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3, 117-127.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R. et al.** (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation; *European Journal of Immunology*, 30, 787-793.

- 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.
- Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H.** (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer; *Nature Reviews Cancer*, 2, 850-861.
- Sonenshine, D. E.** (1991). *Biology of ticks*. Vol.1. New York: Oxford University Press.
- Süss, J.** (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines; *Vaccine*, 21, S19-S35.
- Süss, J.** (2011). Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia - an overview; *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2, 2-15.
- Tatchell, R. J.** (1967). Salivary secretion in the cattle tick as a means of water elimination; *Nature*, 213, 940-941
- Trinchieri, G.** (1989). Biology of natural killer cells; *Advances in Immunology*, 47, 187-376.
- Vančová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Nuttall, P. A.** (2010). Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding; *Veterinary Parasitology*, 167, 274-278.
- Vargin, V. V., Semenov, B. F.** (1986). Changes of natural killer cell activity in different mouse lines by acute and asymptomatic flavivirus infections; *Acta Virologica*, 30, 303-308.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R. et al.** (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis; *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 2065-2072.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L. et al.** (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells; *Science*, 331, 44-49.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., Vivier, E.** (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"; *Blood*, 106, 2252-2258.
- Welsh, R. M., Zinkernagel, R. M.** (1977). Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice; *Nature*, 268, 646-648.

Wengler, G., Wengler, G., Gross, H. J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses; *Virology*, 89, 423-437.

Wikel, S. K. (1996). Host immunity to ticks; *Annual Review of Entomology*, 41, 1-22.

Wikel, S. K. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment; *Frontiers in Microbiology*, 4, 337.

Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern, L., Piesman, J. (2002). Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific; *The Journal of parasitology*, 88, 1276-1278.