

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Interakce myších keratinocytů s virem klíšťové  
encefalitidy, efekt klíštěcích slin**

Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Klára Šabatková  
Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice  
2024

**Magisterská práce:**

Šabatková K, 2024: Interakce myších keratinocytů s virem klíš'ové encefalidity, efekt klíš'těcích slin [Interaction of mouse keratinocytes with TBEV, effect of tick saliva. Master's Thesis, in Czech.] - 74p, Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

**Annotation:**

Ticks are important ectoparasites carrying in their saliva a wide range of pathogens causing infections in animals and humans, including TBEV. The composition of tick saliva allows ticks to suck on the host for long periods of time by modulating host defence mechanisms. This creates a privileged niche for pathogens and facilitates their transmission and dissemination. Keratinocytes are the most numerous cells in the skin and this thesis focuses on their infection by TBEV and the effect of tick saliva on this interaction.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích dne

.....

Klára Šabatková



### **Poděkování**

Chtěla bych tímto poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSs. za vedení mých odborných prací po celou dobu mého studia na Jihočeské univerzitě, zejména pak za odborný dohled při vypracovávání mé diplomové práce, a to jak v její experimentální, tak i teoretické části. Také tímto děkuji mé rodině a blízkým, kteří mě po dobu mého studia podporovali.

# Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Kůže .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.	Epidermis .....	3
1.1.1.1.	Struktura.....	3
1.1.1.2.	Melanocyty.....	4
1.1.1.3.	Merkelovy buňky .....	5
1.1.1.4.	Langerhansovy buňky .....	5
1.1.1.5.	Keratinocyty .....	5
1.1.2.	Zóna dermo-epidermového přechodu.....	9
1.1.3.	Dermis.....	9
1.1.3.1.	Buňky dermis.....	10
<b>1.2.</b>	<b>Klíšťata.....</b>	<b>12</b>
1.2.1.	Sliny klíšťat.....	13
<b>1.3.</b>	<b>Virus klíšťové encefalitidy .....</b>	<b>15</b>
1.3.1.	Struktura a genom TBEV.....	15
1.3.2.	Replikace.....	17
1.3.3.	Přenos viru .....	18
1.3.4.	Imunitní odpověď .....	19
1.3.5.	Nemoc .....	21
<b>2.</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>23</b>
3.1.1.	Myši .....	23
3.1.2.	Morčata .....	23
3.1.3.	Primární kultura .....	23
3.1.4.	Buněčná linie .....	23
3.1.5.	Virus klíšťové encefalitidy.....	24
3.1.6.	Média .....	24
3.1.6.1.	Air médium.....	24
3.1.6.2.	Plating médium .....	24
3.1.6.3.	Growth médium .....	25
3.1.7.	Sliny .....	26
3.1.8.	Extrakt ze slinných žláz.....	26
<b>3.2.</b>	<b>Metody.....</b>	<b>26</b>
3.2.1.	Příprava primární kultury keratinocytů.....	26
3.2.2.	Extrakce slinných žláz a příprava SGE.....	27
3.2.3.	Sběr slin .....	29
3.2.4.	Inkubace se slinami/ SGE a infekce keratinocytů.....	30
3.2.5.	Plaková titrace.....	31
3.2.6.	ELISA .....	32
3.2.6.1.	IL-28B (IFN lambda 3) ELISA .....	33
3.2.6.2.	IFN-β ELISA.....	34
3.2.7.	Stanovení antivirového efektu IFN-lambda a IFN-beta na infekci keratinocytů TBEV, stanovení efektu klíštěcích slin .....	34
3.2.8.	Statistické vyhodnocení dat .....	35

<b>4.</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>35</b>
4.1.	Replikace viru klíšťové encefalitidy v myších keratinocytech.....	35
4.2.	Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech.....	36
4.3.	Vliv extraktu ze slinných žláz na replikaci TBEV v keratinocytech.....	38
4.4.	Porovnání replikace TBEV v keratinocytech pod vlivem klíštěcích slin a SGE.....	42
4.5.	ELISA.....	47
4.6.	Protivirový efekt interferonů na infekci TBEV keratinocytů, vliv klíštěcích slin.....	47
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Abecední seznam zkratk</b> .....	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>60</b>

## 1. Úvod

V teplých měsících každého roku se v lesích, na loukách a dalších příhodných biotopech setkáváme s nepříjemnými ektoparazity – klíšťaty. Klíšťata nejsou jenom nevítanými příživníky sajícími krev, ale také významnými přenašeči celé škály patogenů, což z těchto setkání může činit dlouhodobě nepříjemné situace. Tvrdá klíšťata potřebují k plnému nasátí několik dní, a proto jsou vyzbrojena komplexním složením slin obsahujících molekuly interagující s obrannými mechanismy hostitele, včetně pocitů bolesti a svědění, hemostázy a obou větví imunitního systému. Klíště svým hypostomem narušuje epidermis a proniká hlouběji do dermis, kde se živí z hematomů vznikajících z krve vylité z poškozených cév. Sliny jsou vyplavovány do celého místa poškození a zachytávány vrstvou cementu, který klíšťata tvoří polymerizací proteinů bohatých na glycin a který jim umožňuje lepší přichycení v místě sání a zabraňuje ztrátám prosáknutím. Soubor molekul klíštěcích slin vysoce ovlivňuje místo poškození a vytváří tak privilegovanou niku výhodnou pro přenos mnoha patogenů. Běžným arbovirem přenášeným zejména klíšťaty *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* je virus klíšťové encefalitidy. Rozšiřující se rizikové oblasti, rostoucí výskyt infekcí TBEV a nově vznikající endemické oblasti zdůrazňují význam hlubšího pochopení faktorů ovlivňujících patogenezí tohoto viru. Je známo, že se virus po přenosu v klíštěcích slinách množí v kožních imunitních buňkách schopných migrovat do spádových lymfatických uzlin, kde se TBEV dále replikuje a vyvolává primární virémii. Virus je společně se slinami vyplavován na rozhraní epidermis-dermis a setkává se zde zejména s keratinocyty, jež jsou nejpočetnějšími buňkami epidermis. O interakci keratinocytů s TBEV byla dosud zveřejněna pouze jedna publikace, ve které byla popsána úspěšná infekce keratinocytů virem klíšťové encefalitidy *in vitro*.

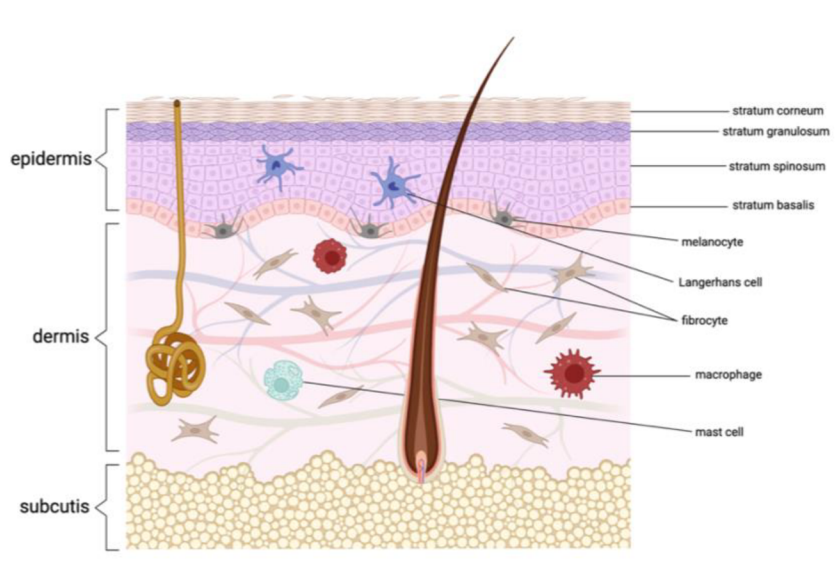
Má práce se zaměřuje na infekci keratinocytů virem klíšťové encefalitidy a zjišťuje vliv klíštěcích slin získaných v různých stádiích sání na tuto interakci. Salivace není kontinuální proces a složení klíštěcích slin se v průběhu sání významně proměňuje. TBEV se v klíštěti nachází ve slinných žlázách a je tedy vyplavován v prvních dnech krmení klíštěte. Pochopení mechanismu, jakým virus klíšťové encefalitidy keratinocyty infikuje a vlivu klíštěcích slin na obranné mechanismy těchto buněk by přineslo cenné informace o reprodukci, přenosu a patogenezí viru, reakci lidského imunitního systému na infekci TBEV a o modulaci této obrany molekulami klíštěcích slin. Poznání faktorů slin ovlivňujících jednotlivé imunitní odpovědi keratinocytů by mohlo přispět k vývoji vakcín proti klíšťatům a ochraně široké veřejnosti před klíšťaty a jimi přenášenými patogeny.

## 1.1. Kůže

Kůže a kožní adnexa (vlasy, nehty, potní, mazové a mléčné žlázy) tvoří největší orgán lidského těla s celkovou plochou přibližně 1,75 m<sup>2</sup>. U dospělého člověka zaujímají až 15% celkové tělesné váhy. Tloušťka kůže se pohybuje od méně než 0,1 mm na očních víčkách po 1,5 mm na dlaních a chodidlech (Kolarsick et al. 2011).

Kůže vytváří ochrannou bariéru před biotickými a abiotickými faktory prostředí, napomáhá udržovat konstantní tělesnou teplotu alterací krevního průtoku pomocí dilatace a konstrikce cév, zprostředkovává hmatové vnímání a brání ztrátám vody z vnitřního prostředí. Je také místem mnohých biochemických dějů. Jedním z nich je syntéza cholekalciferolu (vitamin D3) z provitaminu 7-dehydrocholesterolu působením ultrafialového záření UVB ze slunečních paprsků. Cholekalciferol se dále enzymaticky přeměňuje v játrech a ledvinách na aktivní metabolit vitamínu D kalcitriol, který je nezbytný pro správnou absorpci vápníku a fosforu (Biga et al. 2019). Kůže jako tkáň, která je neustále vystavena vnějším vlivům, je vybavena vrstvami ochranných mechanismů a je důležitou součástí imunitního systému těla. Vytváří anatomickou bariéru oddělující vlastní vnitřní prostředí od okolních cizích faktorů. Ve své struktuře obsahuje imunitní buňky, které zachytávají antigeny a komunikují prostřednictvím chemokinů a cytokinů s cirkulujícími buňkami v krvi. Keratinocyty produkují širokou škálu pro- a protizánětlivých cytokinů a antimikrobiálních peptidů (AMPs), které chrání před bakteriemi, viry a houbami (Mizumoto & Takashi 2004, Clausen & Agner 2016).

Kůže sestává ze tří vrstev, a to epidermis, dermis a subcutis (obrázek 1). Epidermis je tvořena epitelovou tkání, dermis a subcutis tkání pojivovou (Vaňhara et al. 2018).



Obr. 1: Struktura kůže (vlastní ilustrace BioRender app).

### 1.1.1. Epidermis

Vnější vrstvou kůže je epidermis sestávající z několika dalších vrstev. Obsahuje čtyři hlavní typy buněk – keratinocyty, Langerhansovy buňky, melanocyty a Merkelovy buňky. Největší podíl buněk zaujímají keratinocyty. Tvoří až 90% epidermis a nacházejí se ve všech jejích vrstvách. Langerhansovy buňky zprostředkovávají imunologický dohled a zachytávají cizorodé antigeny. Epidermis je zcela avaskulární a je závislá na výživě a odvodu odpadních látek skrze bazální membránu oddělující ji od dermis. Primární funkcí epidermis je sloužit jako fyziologická bariéra zabraňující průniku iritantů a alergenů z vnějšího prostředí (Lawton 2019). Současně brání úniku vody z vnitřního prostředí a tím napomáhá udržení homeostázy. Epidermis sestává na většině míst ze čtyř vrstev, jimiž jsou stratum basalis přiléhající k dermis, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum. Na chodidlech a dlaních je navíc vrstva stratum lucidum mezi stratum corneum a granulosum (Kanitakis 2002, Vaňhara et al. 2018).

#### 1.1.1.1. Struktura

Nejspodnější vrstvou epidermis je stratum basalis. Přiléhá k bazální membráně oddělující ji od dermis a je místem většiny mitotické aktivity v epidermis. Keratinocyty ve stratum basalis jsou cylindrické buňky s apikobazální polarizací uspořádané v jedné vrstvě ležící na bazální membráně (Vaňhara et al. 2018). Keratinocyty často obsahují melaninové pigmenty v melanosomech získané od sousedících melanocytů. Keratinocyty jsou navzájem propojené desmozomy a k bazální membráně jsou připojené pomocí hemidesmozomů. Řídce se ve stratum basalis nacházejí také Merkelovy buňky (Lawton 2019).

Stratum spinosum je tvořena dvěma až pěti vrstvami keratinocytů s trnovitými výběžky v důsledku mezibuněčného propojení desmozomy. Desmozomy jsou tvořeny množstvím adhezních molekul, včetně transmembránových proteinů desmogleinů a desmokollinů, které jsou spojeny s intracytoplazmatickými intermediárními filamenty pomocí plakoglobinu a desmoplakinu. (Barbieri et al. 2014). Ve stratum spinosum se nachází většina Langerhansových buněk.

Stratum granulosum má jednu až deset vrstev buněk. Keratinocyty jsou zde plošší a mají nepravidelný tvar v porovnání s morfologií keratinocytů ve stratum spinosum. Obsahují bazofilní granule keratohyalinu, produkují Odlandova tělíška, lamelární granuly a keratinosomy, které hrají roli ve vytvoření permeabilní bariéry pro vodu a zprostředkovávají buněčnou adhezi ve stratum corneum. Jak keratinocyty maturují a migrují vzhůru do stratum

corneum začínají se připravovat na rozpuštění svých jader a dalších organel (Barbieri et al. 2014, Jiang et al. 2020).

Na dlaních, prstech a ploskách nohou se nachází vrstva stratum lucidum. Jedná se o tenkou, téměř průsvitnou vrstvu tvořenou nejvýše třemi vrstvami plochých keratinocytů. Jádra buněk již nejsou barvitelná a buňky jsou odumřelé. Ketohyalin se přeměňuje na granula eleidinu, který buňky obaluje a brání vstupu i ztrátě vody.

Stratum corneum je semipermeabilní vrstva sloužící jako fyziologická bariéra chránící před externími vlivy a patogeny. Zároveň zabraňuje ztrátě tekutin a rozpuštěných látek z vnitřního prostředí. V této vrstvě jsou keratinocyty terminálně diferencované a za fyziologických podmínek nemají jádro ani organely. Mezi sebou jsou buňky spojeny korneodesmozomy. Ve vrchních vrstvách stratum corneum působí enzymy, jako například steroidní sulfatáza, na komponenty lamelárních granulí, které se rozpadají a probíhá proces deskvamace, tedy odlupování nejsvrchnějších vrstev (Barbieri et al. 2014, Rosso et al. 2016, Vaňhara et al. 2018, Goleva et al. 2019).

#### 1.1.1.2. Melanocyty

Melanocyty jsou derivovány z neurální lišty a nacházejí se v bazální vrstvě epidermis, vlasových cibulkách a ve vnějších kořenových obalech vlasových folikulů. Ve stratum basalis jsou rozprostřeny mezi keratinocyty v poměru přibližně jeden melanocyt na deset ostatních buněk. V kůži, která byla opakovaně vystavována ultrafialovému záření se může množství melanocytů zvýšit. K bazální membráně jsou přichyceny pomocí hemidesmozomů, postrádají ale tonofilemanta a desmozomy. Melanocyty produkují pigment melanin, který absorbuje ultrafialové záření a tím chrání kůži před jeho škodlivými účinky (Lawton 2019). Melaniny jsou skupinou korpuskulárních, intracelulárních, autogenních pigmentů syntetizovaných z aminokyseliny tyrozinu. Jsou zabaleny v buněčném vezikulu odvozeném od Golgiho aparátu, tzv. melanozomu, který je předáván keratinocytům. Jeden melanocyt zásobuje až 36 keratinocytů. Jakmile se melanin dostane do keratinocytů, je koncentrován nad jádrem, které tak chrání před škodlivým ultrafialovým zářením. Produkce melaninu je stimulována MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormon) produkovaným keratinocyty a zvýšenou expresí příslušných receptorů na povrchu melanocytů po expozici kůže slunečnímu záření (Pawelek et al. 1992, Barbieri et al. 2014). Melanin zabarvuje kůži, části oka a další tkáně. Barva kůže je determinována nikoliv množstvím melanocytů, ale velikostí a počtem melanozomů. Melanin existuje ve dvou primárních formách - eumelanin (černý a hnědý) a pheomelanin (červený) (Carletti et al. 2014, Biga et al 2019).



#### 1.1.1.3. Merkelovy buňky

Merkelovy buňky jsou epiteliální buňky neuroendokrinního původu. Tvoří velmi malou část buněk epidermis a můžeme je řídkce najít v bazální vrstvě a v těsné blízkosti vlasových folikulů. Všechny funkce Merkelových buněk nejsou zatím zcela známe. Jednou z popsaných funkcí těchto buněk je sloužit jako mechanoreceptor. Merkelovy buňky jsou součástí diskovitých struktur prostorově asociovaných s vlasovými folikuly společně s dermálními nervy, kde mohou hrát senzickou roli. Také obsahují neuroendokrinní markery, jako je chromogranin A a množství neurosekrečních látek. Některé z těchto látek fungují jako neurotransmitery, zatímco jiné podporují růst a diferenciaci jiných kožních buněčných typů (Barbieri et al. 2014).

#### 1.1.1.4. Langerhansovy buňky

Langerhansovy buňky (LCs) představují specifickou subpopulaci dendritických buněk osídlujících epidermis. LCs jsou antigen prezentující buňky derivované z kostní dřene rovnoměrně distribuované v suprabazální vrstvě epidermis, zejména ve stratum spinosum, v přibližně stejném množství jako melanocyty. Iniciují vrozené i adaptivní imunitní odpovědi na antigeny relevantní pro kůži a působí tak jako imunologičtí strážci. Langerhansovy buňky postrádají desmozomy, k okolním keratinocytům jsou ukotveny pomocí E-kadherinu. Za fyziologických podmínek fagocytují Langerhansovy buňky antigeny, se kterými se setkají v epidermis, následně sníží expresi E-kadherinu, čímž se uvolní vazba na keratinocyty a buňky mohou migrovat do spádových lymfatických uzlin (Barbieri et al. 2014). V lymfatické uzlině prezentují LCs zpracované antigeny CD4+ T lymfocytům s použitím MHC II molekul. Od ostatních dendritických buněk (DCs) mohou být rozlišeny díky vysokým hladinám exprese molekuly CD1a, zatímco jiné DCs vykazují převážně expresi molekuly CD1b (Mizumoto & Takashi 2004). Izoformy skupiny 1 CD1 (CD1a, CD1b a CD1c) exprimované na APC buňkách jsou schopny prezentovat různé formy vlastních a mikrobiálních lipidových antigenů populacím CD4, CD8 a dvojitě negativním T lymfocytům, zatímco izoformy skupiny 2 (CD1d) prezentují neobvyklé glykosfingolipidy NK buňkám (Moody & Porcelli 2003).

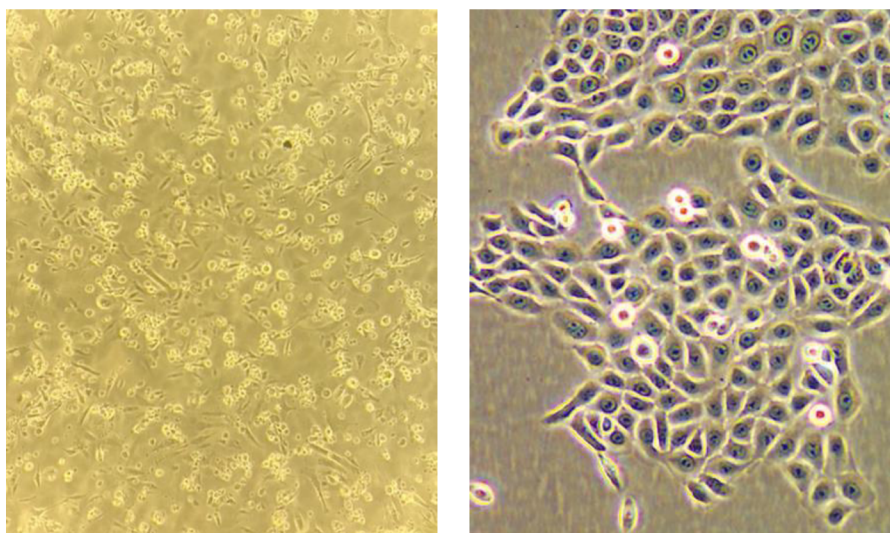
#### 1.1.1.5. Keratinocyty

Keratinocyty jsou nejpočetnějšími buňkami epidermis. Mají ektodermální původ, nachází se ve všech vrstvách a tvoří hlavní strukturní složku epidermis. Morfologicky se od ostatních buněk epidermis odlišují větší velikostí, přítomností desmozomů a větším množstvím cytoplazmy. Keratinocyty vznikají ve stratum basalis z keratinocytových kmenových buněk.



V periodě přibližně 28 dní migrují skrze vrstvy do stratum corneum. Prostupem do vyšších vrstev diferencují a procházejí signifikantními morfologickými i funkčními změnami. Formují vnitřní rigidní struktury složené z keratinu, mikrofilament a mikrotubul v tzv. procesu keratinizace (Barbieri et al. 2014). Nedílnou součástí diference je vápníkový gradient epidermis, který vrcholí v granulózní vrstvě a přispívá k regulaci diference keratinocytů (Bikle et al. 2012).

V lidském genomu je 54 funkčních genů pro keratiny, z nichž polovina je pro keratiny typu I a polovina pro keratiny typu II. Ty jsou exprimovány v různých stádiích diference keratinocytů. Buňky v bazální vrstvě obsahují zejména keratin 5 a 14, zatímco suprabazální keratinocyty exprimují převážně keratin 1 a 10 (Barbieri et al. 2014, Jiang et al. 2020). Keratiny jsou uspořádané do tonofilament, které zajišťují vnitřní buněčnou strukturu a tvoří až 80% proteinů přítomných v keratinocytech. K bazální membráně jsou buňky připojeny pomocí hemidesmozomů a mezi sebou jsou propojeny desmozomy. Ve vrstvě stratum corneum diferencují keratinocyty do terminálního stádia zvaného korneocyty. Ztrácejí jádro, zplošťují se, a nakonec se odlupují v procesu deskvamace (Lawton 2019). V intercelulárním prostoru korneocytů se nacházejí lipidy a proteiny. Keratinocyty v nižších stádiích diference produkují enzymy, které tyto lipidy štěpí na fosfolipidy ceramidy, mastné kyseliny a cholesterol. Společně s korneocyty se tak vytváří kožní lipidová bariéra bránící ztrátám vody a prostupu vnějších stresorů (Lawton 2019).



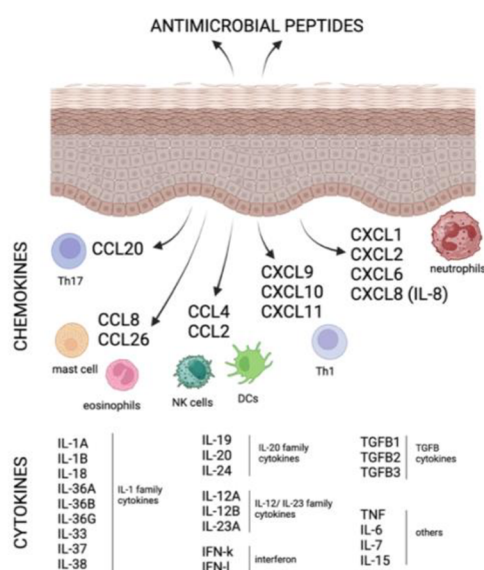
Obr.2: Keratinocyty. Zleva doprava: primární kultura myších keratinocytů; lidské epidermální keratinocyty NHEK-Ad (zdroj: vlastní fotografie; Lonza 2016).

Keratinocyty se aktivně podílejí na udržení homeostázy poživové a krycí tkáně a pomáhají formovat a regulovat imunitní odpověď kůže. Mohou iniciovat širokou škálu zánětlivých reakcí prostřednictvím sekrece celé řady cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Barbieri et al. 2014, Jiang et al. 2020). Keratinocyty jsou vysoce aktivní sentinelové buňky exprimující řadu receptorů PRRs (pattern recognition receptors) a cytokinových receptorů. Mezi PRRs přítomné na keratinocytech patří Toll-like receptory (TLRs), NOD-like receptory (NLRs), RIG-I-like receptory (RLRs) a C-type lektin receptory (CLRs) (Kawai & Akira 2009). Tyto receptory se nacházejí buď ve vnější plazmatické membráně buněk, v cytosolu nebo v membránách vnitřních organel a rozpoznávají struktury typické pro patogeny, tzv. PAMPs nebo signály poškození buněk tělu vlastních, tzv. DAMPs. Interakcí těchto signálů s receptorem dochází k vnitřní kaskádě dějů vedoucí ke změně genové exprese a reakci keratinocytů například produkcí cytokinů. Mezi rozpoznávané PAMPs patří mimo jiné lipopolysacharid, lipopeptidy, beta-glukany, ssRNA, dsRNA, ssDNA a dsDNA (Feliciani et al. 1996, Coates et al. 2018).

Důležitým obranným mechanismem kůže je také produkce antimikrobiálních peptidů (AMPs), jejichž diverzita chrání před virem, bakteriemi, houbami i parazity. Keratinocyty jsou hlavními producenty AMPs, včetně defensinů, katelicidinů, psoriasinu a antimikrobiální RNázy 7 (Suter et al. 2009, Chessa et al. 2020). Exprese AMPs může být zvýšena působením mikrobiálních stimulů, prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17 a IL-22), jako součást proliferace keratinocytů nebo při regeneraci tkáně (Sørensen et al. 2003, Schitteck 2011). Kromě přímého antimikrobiálního efektu působí AMPs chemotakticky na imunitní buňky a dokáží modulovat cytokinovou a chemokinovou produkci (Calusen & Agner 2016). Podskupina AMPs, antivirové proteiny (AVPs) účinkují přímo proti virovým infekcím. Produkce většiny z nich je stimulována produkcí interferonů, jednou z výjimek je produkce AVPs keratinocyty indukovaná IL-27 při infekci virem Zika (Kwock et al. 2020). K vytvoření imunitní bariéry na povrchu kůže přispívá i kyselé pH (4-6), které je udržované produkcí kožního mazu a díky proteinu filaggrinu, který při své degradaci tvoří kyselé produkty. Nízké pH napomáhá k udržení symbiotické kožní flóry a brání výskytu mikrobů způsobujících infekci. Mimo antimikrobiálního efektu ovlivňuje nízké pH funkci kožní bariéry také regulací proteáz a enzymatických dějů metabolismu ceramidů (Proksch 2018, Jiang et al. 2020).

Keratinocyty produkují IL-1 po stimulaci PRRs a zahajují tak zánětlivou imunitní odpověď. Přítomnost IL-1 vede k expresi dalších cytokinů – IL-6, TNF a IL-8 a také podporuje proliferaci keratinocytů (Uchi et al. 2000). Dalším cytokinem, který keratinocyty produkují je IL-18, který mimo jiné zvyšuje IFN- $\gamma$  indukovanou produkci chemokinů (CXCL9, CXCL10

a CXCL11) a expresi MHC I na membránách keratinocytů (Kanda et al. 2007). Mikroby a cytokiny (TNF, IL-17 a IL-22) vyvolávají expresi IL-36, který zahajuje produkci dalších prozánětlivých cytokinů a AMPs a působí na keratinocyty jako autokrinní signál (Carrier et al. 2011). Cytokinem s pleiotropním efektem je TNF (tumor necrosis factor), který má vliv na buněčnou proliferaci, diferenciaci, apoptózu a zánět. Vazbou na receptor TNFR1 jsou aktivovány transkripční faktory vedoucí k expresi prozánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezních molekul (IL-6, IL-6, CXCL8, CCL20 a ICAM-1). Keratinocyty TNF produkují a zároveň exprimují TNFR1 (Tüzün et al. 2007, Jiung et al. 2020). IL-6 je exprimován po stimulaci keratinocytů UVB zářením, prozánětlivými cytokiny nebo aktivací TLRs. Interleukin 6 podporuje proliferaci keratinocytů a jeho přehnaná produkce bývá přítomna při kožních onemocněních, jako jsou psoriáza nebo lupus erythematosus (Jiang et al. 2020). IL-12 je heterodimerický cytokin exprimovaný lidskými keratinocyty a je zapojen do polarizace imunitní odpovědi Th1 směrem a indukcí produkce IFN- $\gamma$  T lymfocyty a NK buňkami (Trinchieri 2003). Dalšími důležitými interleukiny v prostředí epidermis jsou IL-20, IL-7 a IL-15. Při virové infekci, stimulaci TLRs, zánětu či vystavení UV záření produkují keratinocyty interferony. Ty můžeme rozdělit do tří kategorií, a to na a) IFN typu I, kam patří například IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a IFN- $\kappa$ ; b) interferony typu II (IFN- $\gamma$ ), který keratinocyty neprodukují a c) interferony typu III (IFN- $\lambda$ ). Keratinocyty dále produkují růstové faktory (EGF, TGF- $\beta$ , GM-CSF, PDGF a VEGF), chemokiny, proteázy a proteázové inhibitory (obrázek 3) (Jiang et al. 2020).



Obr. 3: Přehled keratinocyty produkováných cytokinů, chemokinů a AMPs (vlastní ilustrace BioRender app).

### 1.1.2. Zóna dermo-epidermového přechodu

Dermo-epidermový spoj je tvořen na rozhraní dermis a epidermis a představuje shluk proteinů a struktur známý jako lamina basalis (bazální membrána). Jedná se o úzkou, několikvrstevnou zónu zajišťující kohezi a propojení mezi těmito dvěma vrstvami. Lamina basalis je produktem epiteliálních buněk epidermis a skládá se ze dvou vrstev – superiorní lamina lucida a inferiorní lamina densa. Pod laminou basalis se nachází lamina fibroreticularis, která je produktem fibroblastů nacházejících se v dermis (Barbieri et al. 2014, Vaňhara et al. 2018). Bazální membrána je zvrásněná a její povrch je protkán kapilárami. Velké zvrásnění bazální membrány vytváří větší plochu, skrz kterou probíhá výměna kyslíku, živin a odpadních produktů mezi dermis a epidermis (Lawton 2019).

### 1.1.3. Dermis

Dermis neboli škůra se nachází pod laminou basalis a má mezenchymální původ. Hlavními funkcemi dermis jsou ochrana hlubších tělních struktur proti mechanickému poškození, zásobování epidermis živinami a kyslíkem a zajištění odvodu odpadních látek. Nezbytná je také v regeneračních procesech. Dermis bývá 15-40krát širší než epidermis, tj. 1-5mm (Lawton 2019). Je tvořena extracelulární matrix, vazivovou složkou obsahující kolagenní, elastická a retikulární vlákna a kotvících fibrily, buněčnými elementy, krevními a mízními cévami a nervovými svazky. Kolagen dodává kůži sílu a odolnost v tahu. Tvoří až 70% proteinů dermis a je kontinuálně rozkládán a syntetizován. Elastická vlákna dodávají kůži pružnost a mají schopnost roztáhnout se až na dvojnásobek své původní délky. Retikulární vlákna jsou velmi tenká a slouží jako kostra pro dermální kapiláry a buňky. Množství kolagenních a elastických vláken v dermis je negativně ovlivněno rostoucím věkem a vystavením ultrafialovému záření (Vaňhara et al. 2018, Lawton 2019).

Dermis je rozdělena do dvou vrstev, jimiž jsou stratum papillare a stratum reticularis. Stratum papillare je tenčí vrstva dermis připojená pomocí kotvících fibril k bazální membráně. Vytváří papily vyběhající směrem do epidermis, které jsou bohatě protkané krevními a lymfatickými kapilárami a nervovými zakončeními. Jedná se o řídké vazivo složené z tenkých kolagenních a elastických vláken. Retikulární dermis je širší a hustší vazivová tkáň se silnými kolagenními a elastickými vlákny. Obsahuje větší krevní a mízní cévy a poskytuje kůži mechanickou odolnost proti tahu a roztržení (Vaňhara et al. 2018, Lawton 2019, Nguyen & Soulika 2019). Hlavními buňkami dermis jsou fibroblasty, dermální dendritické buňky, makrofágy a mastocyty. V případě zánětu či poškození se v dermis mohou nacházet i další infiltrované imunitní buňky. Dermis je bohatě inervovaná senzoryckými a autonomními

nervovými vlákny. Nachází se zde asi milion nervových vláken a řada mechanoreceptorů rozpoznávajících dotek, tlak, vibrace, svědění, bolest a změny teploty (Barbieri et al. 2014). Dále se v dermis nacházejí kožní orgány (adnexa), jakými jsou vlasy, nehty, mazové, potní a mléčné žlázy. Jsou derivovány z epidermis, do dermis vrůstají a diferencují zde. Struktury dermis jsou obklopeny extracelulární matrix, která dovoluje živinám, hormonům a odpadním látkám procházet skrz dermis, dodává kůži mechanickou odolnost a pomáhá udržovat vazivovou síť kolagenních a elastických vláken (Weller et al. 2014).

Pod stratum reticularis se nachází subcutis (podkoží). Subcutis je také mezenchymálního původu a skládá se z řídkého vaziva s regionálně rozdílným podílem podkožního tuku. Tuk je uchováván v tukových buňkách adipocytů a slouží jako zásobárna energie, tepelná izolace a jako tlumič nárazů. Tuková tkáň je prostoupena vazivovými vlákny, které ji ukotvují ke svalové fascii či okostici.

#### 1.1.3.1. Buňky dermis

Dermis obsahuje čtyři hlavní buněčné typy: fibroblasty, makrofágy, dermální dendritické buňky a mastocyty.

Fibroblasty jsou buňky derivované z mezodermu nacházející se ve všech vrstvách dermis. Jsou mitoticky i synteticky aktivní a představují nejhojněji zastoupený typ buněk v dermis. Jsou schopné syntetizovat všechny typy vláknité i amorfní mezibuněčné hmoty, zejména pak kolagen, elastin a další komponenty extracelulární matrix. Fungují jako strukturní a reparační buňky kůže. Strukturní formou fibroblastu je fibrocyt, který je menší, mitoticky i synteticky neaktivní a je obklopen extracelulární matrix. V procesu hojení ran se mohou fibrocyty zpět přeměnit na fibroblasty. Do místa poškození migrují i aktivní fibroblasty na základě chemotaxe růstovými faktory a cytokiny, včetně PDGF. V místě poškození diferencují na myofibroblasty exprimující aktin a desmin hladkých svalů, čímž uzavírají ránu. V neposlední řadě mají fibroblasty také parakrinní a autokrinní funkci, dokáží regulovat proliferaci keratinocytů účastnících se reparačních procesů pomocí produkce růstových faktorů a cytokinů. V dermis můžeme najít tři subpopulace fibroblastů – jednu ve stratum papillae, druhou ve stratum reticularis a třetí je asociována s vlasovými folikuly. Subpopulace se liší v produkci typů kolagenu a komponent extracelulární matrix (Barbieri et al. 2014).

Makrofágy jsou heterogenní skupinou mononukleárních fagocytů. Makrofágy derivované z kostní dřeně cirkulují v krevním oběhu jako monocyty, které se po vycestování z cév do tkání či tělních dutin mění na makrofágy. Tkáňově rezidentní makrofágy mají původ ve



žloutkovém vaku (Gundra et al. 2014, Perdiguero et al. 2015). V periférii se makrofágy setkávají s celou řadou podnětů, které mění jejich genovou expresi a vytvářejí se aktivované makrofágy vybavené k odstranění příčiny svého přílivu a k obnovení homeostázy (Mantovani et al. 2004, Hume 2015). Makrofágy mohou být aktivovány dvěma směry v závislosti na signálech z mikroprostředí. Klasická cesta aktivace zprostředkovaná zejména působením IFN- $\gamma$  a mikrobiálních produktů vytváří prozánětlivou subpopulaci M1, u níž dochází ke zvýšení exprese MHC II molekul, produkci reaktivních radikálů dusíku a kyslíku, efektivní fagocytóze a prezentaci zpracovaných antigenů Th1 lymfocytům (Lee 2019). Subpopulace M2 je aktivována působením cytokinů v kontextu Th2 imunitní odpovědi, zejména pak IL-4. Tyto buňky jsou charakteristické produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ ), účastní se reparačních procesů a hojení tkání a jsou asociovány s infekcí parazity a výskytem tumorů (Mosser 2003, Lee 2019).

Dermální dendritické buňky jsou profesionálními antigen prezentujícími buňkami derivovanými z kostní dřeně. Nezralé dendritické buňky se nacházejí v mukózních tkáních a kůži a rozpoznávají antigeny patogenů pomocí PRRs (pattern recognition receptor). Po setkání s patogenem je fagocytují, maturují a migrují lymfatickými cévami do spádových lymfatických uzlin, kde zpracovaný antigen prezentují na MHC II molekulách CD4+ T lymfocytům (Kotál et al. 2015). Společně s regulačními T lymfocyty jsou dermální dendritické buňky důležité pro tvorbu a zachování periferní tolerance (Lawton 2019). V současné době je známo, že monocytární buňky diferencované z myeloidní linie, včetně makrofágů a dendritických buněk, hrají klíčovou úlohu v polarizaci přirozené i adaptivní imunitní odpovědi. Produkci cytokinů a chemokinů podporují proliferaci T lymfocytů ve směru k imunitní odpovědi Th1 nebo Th2. Zároveň samy podléhají změnám v efektorových a sekrečních funkcích (Mantovani et al. 2004).

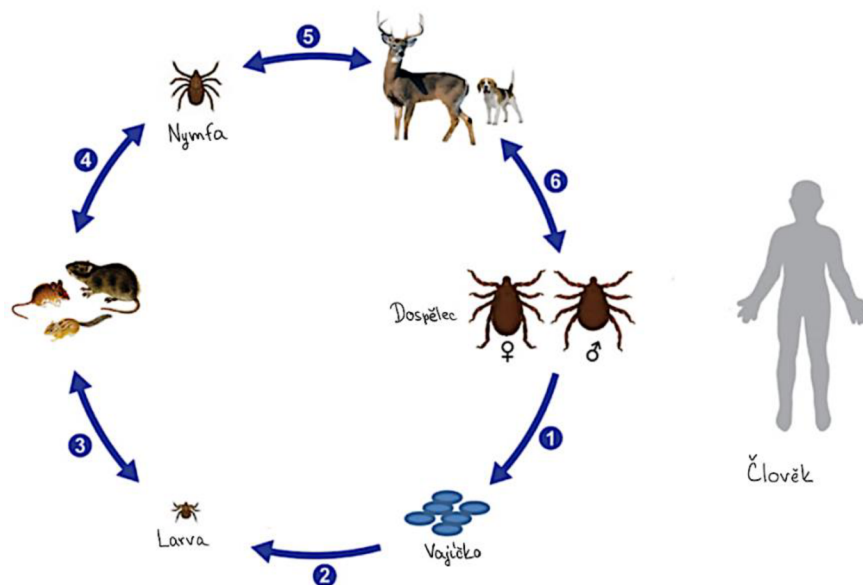
Mastocyty neboli žírné buňky jsou buňky myeloidní linie derivované z kostní dřeně. Krevním oběhem se dostávají do různých tkání, kde pod vlivem lokálních růstových faktorů dozrávají (Lawton 2019). Mastocyty jsou mononukleárními buňkami obsahujícími v cytoplazmě množství sekrečních granul. Na povrchu plazmatické membrány mají Fc $\epsilon$  receptory rozpoznávající Fc oblast IgE. Navázáním alergenu na IgE protilátky na povrchu mastocytů dochází k jejich degranulaci. Na základě obsahu sekrečních granul rozlišujeme dvě hlavní subpopulace mastocytů. MC(T) obsahují ve svých granulích zejména tryptázy a nacházejí se v mukózních membránách gastrointestinálního a respiračního traktu. MC(TC) obsahují v sekrečních granulích mimo tryptáz také chymázy a karboxypeptidázy a nacházejí

se zejména v pojivové tkáni poblíž krevních a mízních cév (Fong & Crane 2024). Mastocyty jsou důležitými buňkami přirozené imunity. Když navázané IgE protilátky rozpoznají antigen a dojde k přemostění dvou Fc receptorů, pak mastocyty degranulují a vypouští do svého okolí obsah svých granul s množstvím mediátorů. Nejdůležitějším mediátorem je histamin, který způsobuje chemotaxi leukocytů, konstriktci hladkých svalů dýchacích cest a zvýšení permeability cév. Mastocyty také syntetizují prozánětlivé prostaglandiny a leukotrieny a jsou velmi důležité v regeneraci tkání a angiogenezi (Fong & Crane 2024).

## 1.2. Klíšťaťata

Klíšťata jsou obligátní, hematofágní ektoparazité patřící do pavoukoců, řádu Ixodida, a dělí se do tří čeledí: Ixodidae (tvrdá klíšťaťata), Argasidae (měkká klíšťaťata) a Nuttallielidae (Oliver 1989). Klíšťaťata jsou rozšířena od tropů po subarktické oblasti a druhová rozmanitost je největší v tropických a subtropických oblastech (Anderson & Magnarelli 2008). Klíšťaťata ke svému vývoji a rozmnožování potřebují živiny získávané z krve hostitelů, zejména z řad obratlovců a jejich sliny slouží jako vehikulum celé řady patogenů. Nejčastěji se jedná o viry a bakterie, ale je možný i přenos hub, prvoků a helmintů (Klompfen et al. 1996). Všechna klíšťaťata procházejí čtyřmi vývojovými stádii. Dospělá, plně nasátá a oplozená samice klade několik stovek až tisíc vajíček do vlhkého substrátu a proces sání a oplození se buď opakuje (měkká klíšťaťata) nebo samice umírá (tvrdá klíšťaťata). Z vajíček se líhnou šestinohé larvy, které po nasátí přecházejí do metamorfózy a stávají se z nich nymfy. Larvy mohou být infikovány transovariálně nebo sáním společně s infikovanými jedinci na jednom hostiteli a může tak i v tomto stádiu docházet k přenosu patogenů. Vzhledem k jejich velikosti si lidský hostitel nemusí být ani vědom přítomnosti klíšťete a může dojít k přenosu například boreliózy tzv. bez klíšťete. Ixoidní klíšťaťata mají pouze jedno stádium nymfy, u argasidních klíšťat je počet stádií druhově variabilní. Měkká klíšťaťata se krmí po dobu několika minut až hodin několikrát v každém ze životních stádií, zatímco tvrdá klíšťaťata zůstávají obvykle přisátá na svém hostiteli, krmí se po dobu několika dnů až týdnů a v každém vývojovém stádiu v případě plného nasátí pouze jednou (Sonenshine & Roe 2014). Klíšťaťata a jimi přenášené nemoci ovlivňují zdraví zvířat a lidí po celém světě a jsou tak příčinou značných ekonomických a hospodářských ztrát (Jongejan & Uilenberg 2004). To z nich činí střed pozornosti mnoha výzkumů, zdravotníků i široké odborné veřejnosti. Zejména zajímavé jsou klíšťecí sliny, které svým komplexním složením bioaktivních molekul dokáží ovlivnit obranné prostředí

hostitelovy tkáně napadené klíštětem ve prospěch parazita (Nuttall & Labuda 2004, Horká et al. 2009, Styer et al. 2011.)



Obr.4: Životní cyklus ixoidních klíšťat. (1) kladení vajíček nakrmenou samicí; (2) vylíhnutí larev z vajíček; (3) larvy se krmí na malých zvířatech; (4) nakrmené larvy se přeměňují v nymfy; (5) nymfy se krmí na větších i malých zvířatech; (6) nymfy se mění v dospělé a krmí se na větších zvířatech i lidech. (převzato a upraveno z Eremeeva et al. 2015)

### 1.2.1. Sliny klíšťat

Klíšťata jsou uzpůsobena dlouhodobému sání krve na hostiteli. Svým hypostomem poškozují pokožku a krmí se z kapky vylévající se krve. Mezidruhově se liší délkou hypostomu a na ní závislé hloubce průniku a také produkcí cementu (Wikel 2013). Zejména ixoidní klíšťata mají velké slinné žlázy produkující sliny bohaté na látky ovlivňující zánět, bolest, svědění, hemostázu a přirozenou a adaptivní imunitu. Sliny jsou vyplavovány do celého místa poškození a dostávají se tak do kontaktu se všemi buňkami kůže, nejvíce pak s keratinocyty, fibroblasty a imunitními buňkami kůže, včetně Langerhansových buněk a dermálních dendritických buněk. Farmakologická aktivita molekul slin je závislá na čase, po který klíště na hostiteli saje a na obranných mechanismech hostitele.

První linií obrany spuštěné při mechanickém poškození kůže hostitele klíštěcím hypostomem je hemostáza zahrnující koagulaci, vazokonstrikci a agregaci destiček. Hemostáza aktivuje komplement a zánět. To se mimo jiné projevuje rapidní infiltrací leukocytů do místa poškození kůže (Francischetti et al. 2009). Zastavit nebo ovlivnit průběh hemostáze pomáhá klíšťatům řada inhibitorů aktivátorů destiček a proteáz, vazodilatantů a dalších molekul ovlivňujících koagulaci. Ve slinách byly identifikovány neproteinové



vazodilatanty prostaglandiny a prostacyklin, protein HSR (histamin releasing factor), velké množství inhibitorů serinových proteáz a řada koagulačních modulátorů přispívajících k vazodilataci a potlačujících krevní srážení (Ribeiro & Francischetti 2003, Dai et al. 2010, Francischetti 2010, Chmelar et al. 2012, Wikel 2013). V krvi se dále nachází kaskáda proteolyticky aktivovaných proteinů zvaná komplement, jejíž aktivace vede k produkci chemotaktických faktorů, opsoninů a tvorbě pórů v membránách mikrobů. Komplement může být aktivován třemi cestami: klasickou, alternativní a lektinovou, které se sbíhají v konverzi C3 složky na C3a a C3b (Sarma & Ward 2011). Obecně se klíšťata nejčastěji zaměřují na inhibici alternativní cesty aktivace komplementu, ale konkrétní inhibitory jsou závislé na druhu klíštěte a neúčinněji blokuji komplement v séru jejich přirozených hostitelů (Lawrie et al. 1999, Wikel 2013). Keratinocyty, endoteliální buňky, kožní rezidentní leukocyty, makrofágy a dendritické buňky se jako první setkávají s molekulami klíštěcích slin, přenášenými patogeny nebo přímo s hypostomem a jsou tak aktivovány. Začínají produkovat prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které společně se složkami komplementu působí chemotakticky pro cirkulující zánětlivé buňky – neutrofile a monocyty (Heath & Carbone 2013, Wikel 2013). Spojnicí mezi přirozenou a adaptivní větví imunitního systému jsou antigen prezentující buňky, zejména pak dendritické buňky a makrofágy. Extrakt ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* vede k redukci fagocytózy a inhibici produkce IFN- $\gamma$ , TNF, superoxidu a NO makrofágy aktivovanými spirochétami borélií, což vede k inhibici jejich zabíjení v myším hostiteli (Kuthejlová et al. 2001, Kýcková & Kopecký 2006). Prostaglandin E2 ze slin klíštěte *I. scapularis* inhibuje produkci TNF a IL-12 dendritickými buňkami aktivovanými skrz TLR-2, TLR-4 a TLR-9, potlačuje schopnost buněk stimulovat specifickou CD4<sup>+</sup> T lymfocytární proliferaci snížením exprese kostimulační molekuly CD40 dendritickými buňkami a snižuje produkci IL-2 (Sá-Nunes et al. 2007). Maturace a diferenciaci dendritických buněk je inhibována také v přítomnosti slin klíšťat *A. cajannese*, *I. ricinus*, *R. sanguineus* a *R. appendiculatus* (Cavassani et al. 2005, Fialová et al. 2010, Preston et al. 2013, Carvalho-Costa et al. 2015). Molekuly ve slinách klíšťat inhibují celou řadu prozánětlivých cytokinů a chemokinů, včetně TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, CCL3 (Vančová et al. 2007, Prevot et al. 2009, Wu et al. 2010). Působí také na proces angiogeneze a snižují rychlost reparace poškozené tkáně navázáním molekul klíštěcích slin na faktory TGF- $\beta$ , PDGF a FGF (Wikel 2013).

Sání klíšťat aktivuje humorální i buněčnou složku adaptivní imunitní odpovědi obratlovců (Brossard & Wikel 2004). Přímou interakcí molekul slin s B a T lymfocyty, redukcí schopnosti

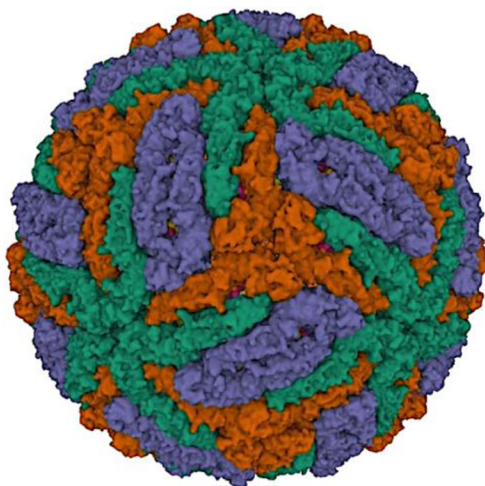
prezentace antigenu a rozpustnými mediátory ovlivňuje klíčtě efektivitu adaptivní reakce. Často bývá potlačena sekrece cytokinů asociovaných s Th1 odpovědí (IL-2, IFN- $\gamma$ ) a podpořena Th2 cytokinová produkce (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) (Steen et al. 2006, Kazimírová & Štibrániová 2013).

### 1.3. Virus klíšťové encefalidity

Virus klíšťové encefalidity způsobuje závažné neurologické onemocnění – klíšťovou encefalitudu. Je jedním z nejčteněji se vyskytujících arbovirů v nejméně 27 evropských a asijských zemích. TBEV je řazen do rodu *Flavivirus* čeledi Flaviviridae, kam patří i další patogeny přenášené klíšťaty a komáry na savčí hostitele, včetně lidí. Jsou jimi například virus žluté horečky, dengue virus, Zika virus, virus japonské encefalidity nebo West Nile virus. Existuje několik subtypů TBEV – evropský, sibiřský, dálněvýchodní (Tonteri et al. 2013) a v poslední době identifikované subtypy Bajkalský a Himálajský (Kozlova et al. 2018, Dai et al. 2018). Ročně je hlášeno až 15 000 případů onemocnění. TBEV je ve většině případů přenášen kousnutím infikovaného klíšťete (Tonteri et al. 2013), někdy je ovšem přenos možný i požitím nepasterovaného mléka (Bogovic & Strle 2015), krevní transfúzí (Leiby & Gill 2004), transplantací orgánů (Lipowski et al. 2017), kojením (Kerlik et al. 2022) a výjimečně i expozicí v laboratoři (Avsic-Zupanc et al. 1995).

#### 1.3.1. Struktura a genom TBEV

Viriony klíšťové encefalidity mají průměr asi 50nm, sférický tvar a jsou srovnatelné s morfologií jiných flavivirů. Jsou složeny z nukleokapsidy (NK) obklopené membránou složenou z lipidů získaných od hostitele, virovými obalovými proteiny (E) a membránovými proteiny (M). Povrch virionu je pokryt malými výstupky tvořenými glykany navázanými na podjednotky proteinu E. Nukleokapsida je formována mnoha kopiemi kapsidového proteinu (C) obalujícími jedinou kopii virové ssRNA o pozitivní polaritě a délce přibližně 11kb (Füzik et al. 2018, Chiffi et al. 2023).



Obr. 5: Struktura virionu klišťové encefalitidy (převzato z Chiffi et al. 2023).

Jednovláknová RNA kóduje jeden otevřený čtecí rámec (ORF), který je lemován nekódujícími oblastmi. Nekódující oblast na 5' konci (5'UTR) je dlouhá 95-132 nukleotidů a je zakončena 5' čepičkou typu I, za kterou následuje konzervovaná struktura smyčky. Na druhém konci je 3'UTR dlouhá 400-700 nukleotidů a je rozdělena na dvě domény, a to 5' koncovou variabilní oblast a 3' koncový core element, který je mezi kmeny TBEV vysoce konzervovaný a obsahuje sekvenci nezbytnou pro replikaci virového genomu (Sakai et al. 2015). Variabilní oblasti se mezi subtypy TBEV liší a někdy obsahují polyA sekvence, jejichž mutace (delece nebo inserce) byly pozorovány u kmenů pasážovaných na savčích buňkách a izolovaných od lidských pacientů a souvisejí s adaptací viru na savčí buňky a virulencí (Formanová et al. 2015, Chiffi et al. 2023).

Otevřený čtecí rámec je překládán do polyproteinu, který je zpracováván virovými a buněčnými proteázami na tři strukturální proteiny (C, prM a E) tvořící stavbu virionu a sedm nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) zodpovědných za replikaci viru v buňce (Pulkkinen et al. 2018). Kapsidový protein C je lokalizován na terminálním konci přepisovaného polyproteinu a translatován jako první. C protein interaguje s virovou RNA a tvoří strukturální komponentu nukleokapsidy. V infikovaných buňkách je C protein akumulován na povrchu endoplazmatického retikula. Dalšími dvěma strukturálními proteiny jsou prM glykoprotein a obalový protein E. Ty jsou spojovány za vzniku heterodimerů, které se začleňují do nezralých virionů. Nejdůležitější funkcí glykoproteinu prM je chaperonová činnost podporující skládání a maturaci proteinu E. Při průchodu nezralých virionů na povrch buňky přes endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex chrání proteiny prM proteiny E v heterodimeru před předčasným splynutím způsobeným nízkým pH v transportním vezikulu. Před opuštěním buňky je prM štěpen proteázou furinem na

membránový protein M, což vede k přeskupení proteinů E na povrchu a zrání virových částic. Protein E se zdá být hlavním faktorem virulence TBEV, jelikož zprostředkovává vstup viru do buněk interakcí s buněčnými receptory. Obsahuje také hlavní virové antigeny, proti nimž jsou vytvářeny neutralizační protilátky (Gritsun et al. 1995, Chiffi et al. 2023, Pustijanac et al. 2023, Kwasnik et al. 2023).

### 1.3.2. Replikace

Virus se při infekci nejprve naváže na receptory na povrchu hostitelských buněk prostřednictvím obalového glykoproteinu E. Do buňky vstupuje endocytózou nebo mikropinocytózou v klathrinových váčcích. Všechny receptory, které virus pro vstup do buňky využívá, se zatím nepodařilo identifikovat. Hlavními kandidáty nebo již popsány receptory jsou vysoce konzervované glykosaminoglykany (heparansulfát),  $\alpha V\beta 3$  integrin nebo protein vázající laminin (Kozlovskaya et al. 2010). Nízké pH endozomálního vezikulu indukuje konformační změny E proteinu, které vedou k přeskupení dimerů do trimerické formy. To indukuje fúzi virového obalu s membránou vezikulu a virová nukleokapsida je dopravena do cytoplazmy, kde je uvolněna RNA. Pozitivně polarizovaná virová RNA slouží jako templát pro transkripci negativního řetězce a pro přímou translaci virového polyproteinu. Po syntéze polyproteinu dochází k jeho štěpení na jednotlivé proteiny. Nově syntetizovaný negativní řetězec je použit pro transkripci pozitivně polarizovaného řetězce virové RNA. Strukturální proteiny prM a E jsou přemístěny do lumen endoplazmatického retikula (ER) a proteiny C zabalí nově syntetizovanou pozitivně polarizovanou RNA do nukleokapsidy. Nukleokapsida je obalena glykoproteiny prM a E spojenými do heterodimerů. Nezralé viriony jsou transportovány přes Golgiho komplex a přeměněny na zralou formu štěpením proteinu prM proteinovou konvertázou furinem přítomnou v Golgiho aparátu. Zralé viriony jsou transportovány sekreční cestou a uvolněny z hostitelských buněk fúzí membrány transportního vezikulu s plazmatickou membránou (Allison et al. 2003 Chiffi et al. 2023, Pustijanac et al. 2023).

Stejně jako všechny RNA viry s pozitivní polaritou, i TBEV se replikuje v cytoplazmě v těsném spojení s intracelulárními membránovými strukturami vyvolanými virem, tzv. replikačními kompartmenty. Tyto kompartmenty vznikají jako invaginace endoplazmatického retikula. Tím, že replikační kompartmenty poskytují lešení pro ukotvení replikačního komplexu omezují difuzi virových a hostitelských proteinů, čímž zvyšují lokální koncentraci složek potřebných pro syntézu RNA a poskytují optimální mikroprostředí pro replikaci virové RNA. Replikační kompartmenty navíc chrání proces replikace viru před kontrolními

mechanismy buňky například zabráněním rozpoznání dvouvláknového meziprojektu RNA buněčnými PRRs (Miorin et al. 2013, Morita & Suzuki 2021).

### 1.3.3. Přenos viru

TBEV byl identifikován ve slinách 22 druhů klíšťat z čeledi *Ixodidae*. Primárním přenašečem je klíště *Ixodes ricinus* v Evropě a *Ixodes persulcatus* v Pobaltí, Rusku, Číně a Japonsku. Mezi další druhy přenašečů patří *Ixodes hexagonus*, *Ixodes ovatus*, *Haemaphysalis spp.* a *Dermacentor spp.* (Pukhovskaya et al. 2018, Boulanger et al. 2019). Klíště se nakazí při sání na infikovaném hostiteli, nejčastěji malých hlodavcích sloužících jako rezervoár viru, nebo při společném sání infikovaného a neinfikovaného klíštěte na hostiteli bez známek infekce. Životní cyklus klíšťat sestává ze čtyř vývojových stádií: vajíčko, larva, nymfa a dospělec. Virus se mezi jednotlivými vývojovými stádii přenáší transstadiálně. Všechna vývojová stádia mohou být zdrojem infekce. Larva, nymfa i dospělec vyžadují krmení, aby mohla přejít do dalšího stádia vývoje. Doba sání se u jednotlivých stádií liší – larvy se krmí 2-4 dny, nymfy 3-5 dní a dospělé samice až 10 dní.

Virus klíšťové encefalitidy se množí ve střevech klíštěte a poté migruje do slinných žláz, které jsou zdrojem infekce pro dalšího hostitele. Při sání je virus do hostitele vyplavován společně se slinami v prvních 24-48 hodinách. Klíšťata sají také na větších savcích, jakými jsou například srny, jeleni, kozy, ovce nebo krávy. Větší zvířata sice vykazují většinou pouze nízký stupeň virémie, nicméně virus se může z krve přenášet do mléčných žláz a následně se vylučovat v mléce, které může být zdrojem infekce pro člověka konzumujícího nepasterizované mléko či mléčné výrobky (Donchenko et al. 2005, Holzmann et al. 2009, Caini et al. 2012). Lidé jsou považováni za náhodné hostitele klíšťat, což znamená, že se u nich může rozvinout virémie a onemocnění, ale jsou mrtvým bodem přirozeného cyklu viru (Chiffi et al. 2023). Nejčastěji se člověk nakazí právě kousnutím infikovaného klíštěte.

Pro rozvoj infekce musí virus překonat několik ochranných bariér lidského hostitele. To zprostředkovávají molekuly v klíštěcích slinách, které úspěšně modulují a potlačují obranné reakce, včetně pocitu bolesti, svědění, hemostázy, zánětu a adaptivní imunity. Prvotní replikace TBEV probíhá lokálně v místě kousnutí klíštětem, především pak v dermálních dendritických a Langerhansových buňkách, které po aktivaci migrují do spádových lymfatických uzlin. V lymfatických uzlinách dochází k další virové replikaci, šíření viru do krevního oběhu a primární virémii. Pokud není virus v této fázi odstraněn imunitním systémem hostitele, rozšíří se do periferních orgánů a tkání, což vede k sekundární virémii (Ruzek et al. 2019, Chiffi et al. 2023).



Během sekundární virémie může TBEV překonat hematoencefalickou bariéru, která fyziologicky a anatomicky chrání centrální nervový systém, odděluje mozkový intersticiální prostor od krevního řečiště, poskytuje kontrolované mikroprostředí nezbytné pro komplexní nervovou signalizaci a interakce mozku a usnadňuje komunikaci mezi periferií a CNS, především prostřednictvím cytokinů (Dörrbecker et al. 2010). Propustnost endotelových buněk hematoencefalické bariéry může být působením cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6) zvýšena. Mechanismem „trojského koně“ proniká TBEV do CNS v infikovaných buňkách imunitního systému, včetně dendritických buněk, monocytů, neutrofilů, makrofágů nebo T lymfocytů (Banks & Erickson 2010, Dörrbecker et al. 2010). Dalším možným vstupem je infekce endoteliálních buněk nebo buněk epitelu choroidálního plexu, při které dochází k pučení viru na druhé straně hematoencefalické bariéry. Histopatologické studie u lidí ukazují, že po vstupu do CNS vykazuje TBEV afinitu k buňkám bazálních ganglií, mezencefalu, diencefalu, prodloužené míše a k buňkám předních rohů míšních (Gelpi et al. 2005, Ruzek et al. 2019).

Při přenosu z nepasterovaného infikovaného mléka přežívá virus v kyselém prostředí žaludku až dvě hodiny, což umožňuje jeho průchod do duodena, kde infikuje buňky střevního epitelu. Odtud je přenášen na dendritické buňky, jež po aktivaci migrují do spádových lymfatických uzlin a proces pokračuje podobně, jako při kousnutí klíštětem (Dörrbecker et al. 2010, Chiffi et al. 2023).

#### 1.3.4. Imunitní odpověď

Virus klíšťové encefalitidy je buňkami přirozené imunity rozpoznáván pomocí Toll like receptorů a RIG-I-like receptorů (Takeuchi & Akira 2009). Tím je aktivován IFN regulační faktor IRF-3 a je podnícena sekrece interferonů, především pak IFN typu I, která je první linií protivirové obrany. Tato odpověď kontroluje šíření patogenu tím, že reguluje syntézu inhibičních efektorových proteinů a cytokinů (Dörrbecker et al. 2010, Chiffi et al. 2023).

Řada flavivirů včetně TBEV způsobuje stres endoplazmatického retikula buď hromaděním virových proteinů nebo modifikací membrán ER. To pak může vést k aktivaci dráhy odpovědi na nesložené proteiny (unfolded protein response, UPR) prostřednictvím stresové reakce způsobené hromaděním nesložených nebo chybně složených proteinů v ER. Bylo prokázáno, že tato dráha UPR je aktivována dříve, než dráha IRF-3 indukuje příslušné geny. Reakce nesložených proteinů jako taková představuje fyziologickou reakci buňky po virové infekci, a navíc podporuje rozpoznávání vzorů prostřednictvím dráhy IRF-3, aby umožnila protivirovou odpověď s vyšší účinností (Kunitski et al. 2019).

Účinná obrana hostitele proti virové infekci vyžaduje kombinované působení vrozeného a adaptivního imunitního systému, které propojují zejména dendritické buňky (Mellman 2013). Nezralé dermální dendritické buňky a Langerhansovy buňky nacházející se v kůži fagocytují TBEV a migrují do spádových lymfatických uzlin, kde po dozrání prezentují antigeny a aktivují naivní T-lymfocyty, které následně diferencují na Th1, Th2 a Tc lymfocyty (Dörrbecker et al. 2010). Virus nebo molekuly klíštěcích slin mohou ovlivňovat funkce dendritických buněk. Infekce virem Langat, který je blízce příbuzný TBEV narušuje proces zrání DC potlačením exprese kostimulačních molekul a inhibicí produkce IL-12. Takto potlačený nezralý fenotyp nemůže aktivovat a indukovat proliferaci T lymfocytů (Labuda et al. 1996, Robertson et al. 2014).

Dalšími důležitými buňkami migrujícími do místa infekce jsou neutrofilové. Ty, v odpovědi na TNF- $\alpha$ , zvyšují svou fagocytickou aktivitu, degranulaci a množství volných radikálů kyslíku a dusíku. Prozánětlivé cytokiny produkované aktivovanými neutrofilami působí chemotakticky na makrofágy a dendritické buňky (Dörrbecker et al. 2010, Chiffi et al. 2023). NK buňky jsou v protivirové imunitě důležité, jelikož rozpoznávají a zabíjejí infikované buňky v časně fázi infekce, čímž omezují replikaci a šíření viru. NK buňky zprostředkovávají cytolyzu infikovaných buněk sekrecí cytoplazmatických granulek obsahujících perforin a granzymy, indukci apoptózy pomocí Fas ligandu a na protilátkách závislé cytotoxicitě (ADCC). Dále produkují řadu cytokinů a chemokinů, čímž přímo modulují adaptivní imunitní odpověď (Jost & Altfeld 2013). CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty rozpoznávají virové antigeny v kontextu s MHC I. a II. třídy. Cytotoxické CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty zabíjejí infikované buňky sekrecí perforinu a granzymů a sekrecí cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF a IL-2). T-lymfocyty se po aktivaci diferencují na specifický typ a po likvidaci infekce část z nich zůstává ve formě paměťových T-lymfocytů, které dlouhodobě přežívají a při opětovné expozici stejnému antigenu podléhají robustní proliferaci s efektorovou funkcí (Blom et al. 2018). CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty kontrolují virovou infekci různými mechanismy, včetně aktivace zánětlivé odpovědi, aktivace CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, produkce zánětlivých a protivirových cytokinů nebo přímých cytotoxických účinků proti infikovaným buňkám prostřednictvím ligandu Fas (Ruzek et al. 2019).

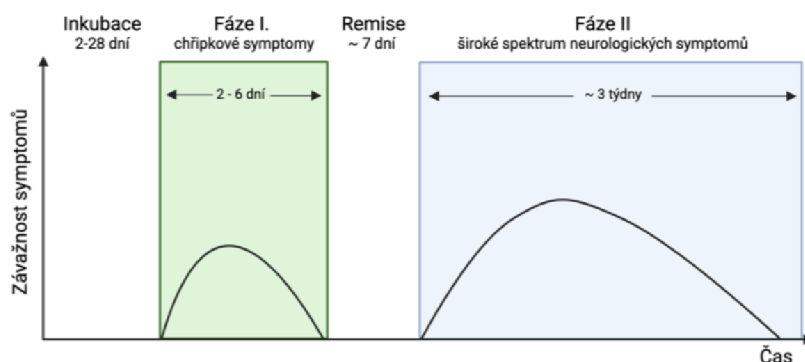
Zdá se, že náchylnost ke klíšťové encefalitidě je ovlivněna mutacemi v chemokinovém receptoru CCR5, který je exprimován širokou škálou leukocytů, včetně aktivovaných T-buněk, NK-buněk a monocytů/makrofágů. CCR5 hraje důležitou roli při transmigraci leukocytů přes hematoencefalickou bariéru. Bylo prokázáno, že delece v CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32) je významně častější u pacientů s TBE než v běžné/odpovídající kontrolní zdravé populaci.

To naznačuje, že CCR5 má zásadní význam pro nasměrování T-lymfocytů směrem k mozku za účelem odstranění infekce (Kindberg et al. 2008, Dörrbecker et al. 2010).

Dalším důležitým aspektem imunitní odpovědi proti TBEV jsou protilátky produkované aktivovanými B lymfocyty. Nacházejí se v krvi a mozkomíšním moku. Neutralizační protilátky nejčastěji cílí na epitopy virového glykoproteinu E a využívají tři mechanismů účinku: přímá inhibice vazby na receptor, neutralizace uvnitř endozomu a Fc receptorem zprostředkovaná lýza buňkami retikuloendoteliálního systému. Ochranu poskytují také protilátky anti-NS1, které se pravděpodobně váží na NS1 antigen prezentovaný na povrchu infikovaných buněk a spouští tak jejich lýzu komplementem nebo ADCC (Ruzek et al. 2019, Salat et al. 2020).

### 1.3.5. Nemoc

Nemoc se manifestuje u většiny nakažených TBEV. Rozdílné subtypy viru se vzájemně liší mírou virulence a závažnosti onemocnění, kdy nejvyšší mortalitu vykazuje dálně východní TBEV (30%), poté sibiřský (6-8%) a nejméně evropský (1-2%) (Tonteri et al. 2013). Infekce evropským subtypem TBEV je typicky dvoufázové onemocnění. První fáze odpovídá primární virémii a objevuje se 2-28 dní po infekci. Charakteristické projevy připomínající chřipku zahrnují myalgie, artralgie, únavu, cefaleu a bolest v krku doprovázené febriliemi a někdy zvracením. Po 2-7 dnech symptomy většinou odezní. Ve druhé fázi přicházející po asymptomatické pauze se začínají objevovat neurologické příznaky, které jsou velmi interindividuálně variabilní (Ruzek et al. 2019). Klinické manifestace infekce CNS mohou zahrnovat meningitidy, encefalitidy, myelitidy, radikulitidy nebo kombinace výše zmíněných. V porovnání s evropským subtypem, dálně východní a sibiřský způsobují většinou jednofázové onemocnění (Mansfield et al. 2009, Růžek et al. 2010). Průběh onemocnění je znázorněn na obrázku 6.



Obr. 6: Bifazická manifestace klišťové encefalitidy (vytvořeno v BioRender app).



Lidé, kteří onemocněli klíšťovou encefalitidou si mohou nést dlouhodobé následky onemocnění, což představuje významnou část celkové medicínské zátěže způsobené TBEV. Kromě paralytických syndromů se u 40-50% pacientů po akutní klíšťové encefalitidě objevuje postencefalický syndrom (PES), který má vliv na základní denní aktivity a kvalitu života. Nejčastějšími příznaky jsou kognitivní poruchy, neuropsychiatrické potíže, včetně apatie, podrážděnosti, problémů s pamětí a soustředěním, a změna spánkového režimu (Bogovic & Strle 2015, Ruzek et al. 2019).

Na klíšťovou encefalitidu neexistuje žádná specifická protivirová léčba. Pacienti jsou hospitalizováni na základě závažnosti projevů onemocnění a léčeni symptomaticky. Jedinou účinnou profylaxi proti TBEV zůstává imunizace. Vakcína proti TBEV sestává ze tří dávek v prvním roce a poté jedné posilující dávky každých tři až pět let (Chrdle et al. 2016). TBEV vakcína je vysoce účinná a úspěšné vakcinační programy významně zredukovaly množství TBE případů v endemických zemích.

## 2. Cíle práce

---

- Příprava primární kultury myších keratinocytů
- Příprava extraktu ze slinných žláz *Ixodes ricinus*
- Infekce keratinocytů TBEV s a bez klíštěcích slin/ SGE; vyhodnocení vlivu klíštěcích slin/ SGE na virovou replikaci
- Vyhodnocení imunitní odpovědi keratinocytů
  - Detekce přítomnosti a množství IFN- $\lambda$  a IFN- $\beta$
  - Zjištění antivirového efektu interferonů při infekci keratinocytů TBEV
  - Zhodnocení efektu klíštěcích slin/ SGE na protektivní funkci interferonů

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Myši

V diplomové práci byla pro získání primární kultury myších keratinocytů použita čerstvě narozená mláďata inbredního kmene myši C57BL/6N odejmutá od matky 2-5 dní po narození. Myši byly chované za standardních podmínek ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

#### 3.1.2. Morčata

Morčata byla použita k nasátí klíšťat. Část klíšťat sajících na morčatech byla použita pro sběr klíštěcích slin a část k extrakci slinných žláz. Morčata byla chována za standardních podmínek ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky.

#### 3.1.3. Primární kultura

K pokusům byla použita primární kultura myších keratinocytů získaná trypsinizací kůží čerstvě narozených myši. Buňky byly seškrabány ze spodní strany epidermis a následně promyty. Po získání byly keratinocyty první den kultivovány v Plating médiu v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Následující den jim bylo médium vyměněno za růstové médium pro keratinocyty, ve kterém byly nadále kultivovány.

#### 3.1.4. Buněčná linie

K vyhodnocení pokusů metodou plakové titrace byla použita buněčná linie A549 (imortalizovaná buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic), která byla kultivována v DMEM médiu (10% BOFES, ATB, glutamin) při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Složení média je popsáno v tabulce I. A549 jsou buňky přisedlé a jejich pasáž je prováděna třikrát týdně.

*Tab. I: Složení média pro kultivaci buněčné linie A549.*

<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
DMEM	Biosera
glutamin	Biosera
ATB (streptomycin + penicilin)	Biosera
10% BOFES	Biowest

### 3.1.5. Virus klíšťové encefalitidy

K infekci keratinocytů byl použit český kmen Hypr viru klíšťové encefalitidy pomnožený na VERO buňkách. Titr tohoto kmene byl  $5 \cdot 10^7$  PFU/ml.

### 3.1.6. Média

#### 3.1.6.1. Air médium

Air médium bylo použito jako první médium při přípravě primární kultury keratinocytů. Oddělovaly se v něm vrstvy kůže – epidermis od dermis a proběhla v něm první dvě promytí získaných keratinocytů. Složení média je popsáno v tabulce II.

*Tab. II: Složení Air média.*

<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
RMPI + GL + HEPES	Gibco
ATB (streptomycin + penicilin)	Biosera
Dialyzované FBS (fetální bovinní sérum)	Gibco

#### 3.1.6.2. Plating médium

Plating médium bylo použito ke dvojímu propláchnutí získaných keratinocytů po promytí buněk Air médiem. Zároveň bylo použito k prvnímu nasazení keratinocytů na panely a k jejich kultivaci v průběhu primárních 24 hodin. Složení média je popsáno v tabulce III.

*Tab. III: Složení plating média.*

<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
MEM $\alpha$	Gibco
ATB (streptomycin + penicilin)	Biosera
glutamin	Biosera
Dialyzované FBS (fetální bovinní sérum)	Gibco
ITS (insulin-transferin-selenium)	Gibco
EGF Human Recombinant (epidermal growth factor, 500ug/ml)	Gibco
1M CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich

### 3.1.6.3. Growth médium

Growth (růstové) médium bylo ke keratinocytům přidáno po primární kultivaci v Plating médiu a bylo použito k jejich následné kultivaci i ve všech následujících experimentech s keratinocyty.

*Tab. IV: Složení růstového média.*

<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
Keratinocyte – SFM	Gibco
ATB (streptomycin + penicilin)	Biosera
glutamin	Biosera
BSA (bovine serum albumin, 50mg/ml v MEM $\alpha$ + 1% ATB)	Biowest
ITS (insulin-transferin-selenium)	Gibco
1M CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
EGF Human Recombinant (epidermal growth factor, 500ug/ml)	Gibco
BPE (bovine pituitary extract)	Gibco

### 3.1.7. Sliny

Sliny byly získány z dospělých samic *Ixodes ricinus*. Klíšťata sála na morčatech po dobu 6-7 dní, načež byla manuálně odstraněna, aby nedošlo k jejich plnému nasátí. Salivace byla stimulována 5% roztokem pilokarpinu v 70% etanolu a sliny byly sesbírány do kapiláry, přefiltrovány a pro pozdější pokusy uchovány při teplotě -70 °C.

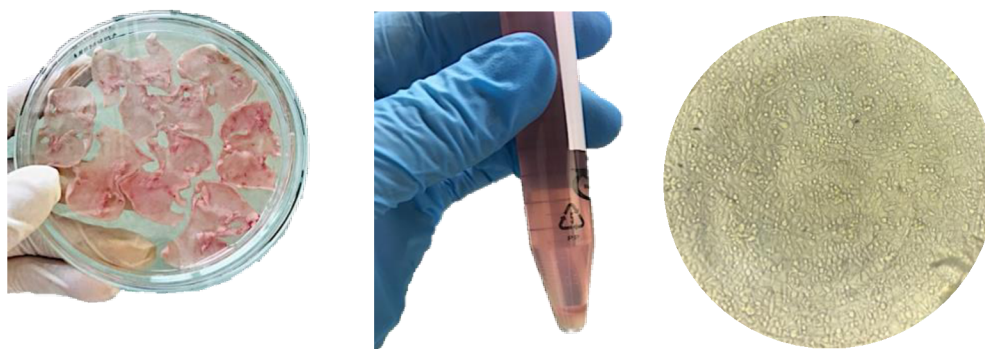
### 3.1.8. Extrakt ze slinných žláz

Extrakt ze slinných žláz (SGE) byl získán z dospělých samic klíšťat *Ixodes ricinus* sajících na morčatech. Klíšťata byla z morčat odstraněna manuálně, tzn. že nedošlo k plnému nasátí klíšťat a samovolnému odpadnutí. Klíšťatům byly extrahovány slinné žlázy, které byly v PBS zhomogenizované a pro následující pokusy naředěné v růstovém médiu na koncentraci 20ug/ml. Extrakt ze slinných žláz byl uchován ve zkumavce při teplotě -70 °C.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Příprava primární kultury keratinocytů

Mláďata myšního inbredního kmene C57BL/6N stará 3-5 dní byla nejdříve zabita zchlazením na ledu a dekapitací. Následně jim byl odstraněn ocas a končetiny a tělo bylo omyto v 70 % etanolu. Ke stažení kůže byly použity ostré nůžky, kterými byla nastřížena dorsální strana těla směrem od ocasu ke krku. Poté bylo obnažené tělo uchopeno jednou pinzetou a druhou byla celá kůže stažena. Kůže byla omyta v 70 % etanolu, vymačkána pinzetou a vložena do Petriho misky s 0,25 % trypsinem v HBSS, kde byla inkubována přes noc při 4°C.



Obr. 7: Příprava keratinocytů. Zleva doprava: kůže mláďat namočené v 0,25% trypsinu; sediment tvořený keratinocyty po centrifugaci; keratinocyty čtvrtý den po nasazení. (vlastní fotografie).

Druhý den proběhla vlastní trypsinizace v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 15 minut. Po dokončení inkubace byly kůže přeneseny do Petriho misky naplněné 15ml Air média, v níž byla oddělena epidermis od dermis a pomocí stěrky seškrábány keratinocyty ze spodní strany epidermis. Následně bylo zakalené médium s keratinocyty přeneseno do centrifugační zkumavky a stočeno po dobu 5 minut při 1000rpm. Poté byl odsát supernatant, přidáno médium, buňky resuspendovány a centrifugace a promytí buněk provedeny ještě třikrát – jednou s Air médiem a dvakrát s Plating médiem. Po posledním promytí bylo k buňkám přidáno Plating médium a keratinocyty byly spočítány v Bürkerově komůrce. Po spočítání bylo ke keratinocytům přidáno takové množství Plating média, aby se dosáhlo požadovaného množství buněk pro nasazení.

Keratinocyty byly při první přípravě nasazeny na tři panely o 6 jamkách. Do každé jamky byly nasazeny 2ml buněčné suspenze v množství 2 x 10<sup>5</sup> buněk/ ml. Při další přípravě keratinocytů byly v tomto kroku použity 96 jamkové panely, kde bylo do každé jamky nasazeno 200ul buněčné suspenze v množství 2 x 10<sup>5</sup> buněk/ ml. Panely byly přes noc inkubovány v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Další den byly buňky nejdříve zkontrolovány pod mikroskopem a následně jim bylo vyměněno médium za růstové médium pro keratinocyty, ve kterém byly nadále kultivovány. Médium bylo měněno každé tři dny.

Část buněk byla zamrazena. Keratinocyty byly uvolněny ze dna panelů pomocí trypsinu a rozsuspendovány v médiu. Polovina keratinocytů byla zamrazena v Air médiu a druhá v Growth médiu. Do kryozkumavek bylo přidáno 900ul buněčné suspenze spolu se 100ul dimethylsulfoxidu jako kryoprotektiva. Zkumavky byly nejdříve zamrazeny při -70 °C po dobu 4 hodin a poté přesunuty do tekutého dusíku.

### 3.2.2. Extrakce slinných žláz a příprava SGE

Při přípravě extraktu ze slinných žláz jsme postupovali dle protokolu Patton et al. 2012. Extrakt ze slinných žláz byl připravován ze samic klíštěte *Ixodes ricinus* sajících na morčatech po dobu 1, 3 a 6 dní. Morčatům byla oholena záda, na lysé místo byl pomocí lepidla přilepen molitanový kroužek, do kterého byla nasypána klíšťata a byl překryt sítkou (obrázek 2). Klíšťata sající po dobu 1 dne sála na jednom morčeti. Klíšťata krmící se po dobu 3 a 6 dní sála společně na druhém morčeti.





*Obr. 8: Morče s molitanovým kroužkem určeným k sání klíšťat (autorka ilustrace: Zuzana Šabatková).*

Před vlastní autopsií byla připravena binolupa, sklíčka s oboustrannou lepící páskou, pinzety a nůžky vydesinfikované 70% etanolem, kádinka s 15% etanolem a dvě zkumavky s PBS. Klíšťata byla nejdříve desinfikována v 15% etanolu, osušena buničinou a přilepena ventrální částí na oboustrannou lepící pásku na sklíčku. Pod binolupou byla klíštěti odstřižena dorsální část a obnaženy orgány. Na sklíčko a otevřené klíště bylo naneseo několik kapek PBS a pomocí pinzety byla z dutiny opatrně odstraněna střeva, čímž došlo k ozřejmění slinných žláz. Ty byly pomocí jiné pinzety opatrně vyjmuty a omyty v několika kapkách PBS umístěných na podložním sklíčku. Slinné žlázy byly sesbírány do zkumavky obsahující 300ul PBS a uchovány při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pitvu klíštěte dokumentuje obrázek 3.



*Obr. 9: Pitva klíštěte nasátého 3 dny prováděná pod binolupou. Zleva doprava: klíště přilepené na podložním sklíčku; odstřižený hřbet a obnažená střeva; odstraněná střeva a viditelné slinné žlázy; slinné žlázy v PBS (vlastní fotografie).*

Po extrakci slinných žláz ze všech klíšťat proběhla homogenizace vzorků. Vzorky byly rozmrazeny a přeneseny do zkumavek určených k homogenizaci. Do každé zkumavky byla vložena homogenizační kulička a objem byl doplněn na 500ul pomocí PBS. Vlastní homogenizace proběhla po dobu 3 minut a poté byly vzorky centrifugovány při 5000rpm po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl odsát do nové zkumavky.

Ve zhomogenizovaných vzorcích byla změřena koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové. Absorbance byla měřena ve vlnových délkách 450nm a 595nm a vypočítána dle rovnice kalibrační přímky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce V.

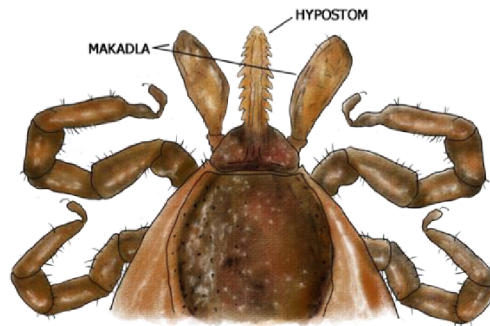
*Tab. V: Počty klíšťat sajících daný počet dní a koncentrace proteinu v SGE.*

<b>Doba sání</b>	<b>Počet klíšťat</b>	<b>Koncentrace proteinu (ug/ml)</b>
1 den	24	487,899
3 dny	15	442,648
6 dní	15	898,779

### 3.2.3. Sběr slin

Sliny byly získány z dospělých samic druhu *Ixodes ricinus* sajících na morčatech po dobu 7 dní. Po manuálním odstranění z morčat byla klíšťata umístěna na podložní sklíčko a znehybněna pomocí oboustranné lepicí pásky. Na hypostom a jednu palpu (makadlo) jim byla připevněna kapilára, která byla navíc ještě fixována pomocí plastelíny (obrázek 10). Na hřbet samic byl nakapán 5% roztok pilokarpinu v 70% etanolu v množství 1ul na jedno klíště. Roztok indukoval salivaci a sliny byly jímány do připevněné kapiláry. Klíšťata byla takto umístěna do vlhké komůrky a ponechána po dobu 2 hodin v termostatu při teplotě 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí této doby byly sliny sesbírány a přefiltrovány přes filtr 0,22 um pro zajištění sterility. Ve slinách byl určen obsah proteinu metodou dle Bradfordové. Pro následující pokusy byly použity sliny s koncentrací proteinu 450ug/ml, které byly naředěny v růstovém médiu na 20ug/ml. Sliny byly uchovány ve zkumavce při teplotě -70 °C.



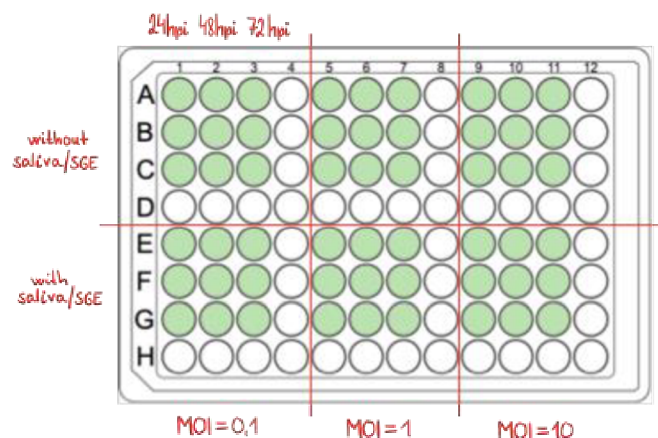


Obr. 10: Schéma gnathosomy klišťe. Kapilára je nasazována na hypostom a jedno makadlo (autorka ilustrace: Zuzana Šabatková).

### 3.2.4. Inkubace se slinami/ SGE a infekce keratinocytů

Infekce keratinocytů byla provedena celkem čtyřikrát, a to se slinami a SGE. Keratinocyty byly vždy nasazeny na 96j panely a kultivovány až do vytvoření souvislé vrstvy buněk. Jamky panelu byly rozděleny do dvou skupin – se slinami/ SGE (S+) a bez slin/ SGE (S-). Všechny vzorky byly provedeny v triplikaci.

Z jamek bylo odsáto médium a ke skupině S+ bylo přidáno růstové médium obohacené o sliny/ SGE s koncentrací proteinu 20ug/ml v množství 100ul/ jamku. Ke druhé skupině bylo přidáno stejné množství čistého růstového média. Takto připravený panel byl inkubován po dobu 1 hodiny v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.



Obr. 11: Schéma rozdělení panelu pro infekci keratinocytů se slinami/ SGE (vlastní ilustrace).

Po preinkubaci byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem, aby se vyloučil přímý vliv slin na keratinocyty. K buňkám byl přidán virus klišťové encefalidity českého kmene

Hypr ve třech rozdílných multiplicitách: 0,1, 1 a 10. Virus byl ze zásobní koncentrace  $5 \cdot 10^7$  PFU/ml naředěn v růstovém médiu a přidán do příslušných jamek v množství 100ul/ jamku. Následovala adsorpce v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci byl obsah jamek odsát a buňky byly dvakrát promyty 200ul/jamku růstového média, aby se odplavily nenavázané virové částice. Po promytí bylo k S- polovině panelu přidáno 200ul/ jamku čistého růstového média a k S+ polovině stejné množství média se slinami/ SGE v koncentraci proteinu 20ug/ml. Panely byly inkubovány v termostatu při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> a vzorky byly odebírány v intervalech: 1, 3 a 7dpi pro infekci se slinami a 1, 2 a 3dpi pro vzorky s extraktem ze slinných žláz.

V každém časovém intervalu bylo odebráno 150ul supernatantu. Vzorky byly uchovány zmražené při -70 °C pro pozdější stanovení titru viru a interferonu.

### 3.2.5. Plaková titrace

Ke stanovení titru viru v odebraných vzorcích byla použita metoda plakové titrace, která byla prováděna na buňkách A549.

Buňky byly ze dna kultivační lahve uvolněny pomocí verzeny a trypsinu, rozsuspendovány v médiu, spočítány v Bürkerově komůrce a naředěny v kultivačním médiu na koncentraci buněk  $3 \times 10^5$  buněk/ ml. Takto připravená suspenze byla uložena do lednice, aby se zamezilo adhezi buněk.

Plaková titrace byla prováděna na 24 jamkových panelech. Do každé jamky bylo nanášeno 180ul kompletního DMEM média. Výjimkou byly první jamky vzorků odebraných 1dpi, které byly ponechány prázdné. Poté byly do prvních jamek nanášeny analyzované vzorky. U vzorků odebraných 1dpi bylo nanášeno 100ul/ jamku, u vzorků odebraných ve všech ostatních dnech bylo nanášeno 20ul/ jamku. Následovalo desítkové ředění přímo v jamkách panelu. Do každé jamky bylo přidáno 300ul buněčné suspenze A549. Panely byly promíchány ve vertikálním a horizontálním směru a inkubovány při 37 °C a 5%CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí 4 hodin inkubace byly buňky převrstveny 400ul pokrývky, která byla předtím připravena z karboxymethylcelulózy a 2x koncentrovaného DMEM v poměru 1:1. Panely byly inkubovány po dobu 5 dní při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí doby inkubace bylo provedeno barvení ke zviditelnění vzniklých plaků (buňky zlyzované virem). Nejprve byly panely promyty ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl v destilované vodě) a poté ponechány ponořené v naftalenové černi v kyselině octové po dobu 45 minut. Všechny chemikálie použité k plakové titraci jsou uvedeny v tabulce VI. Po

obarvení byly panely promyty pod tekoucí vodou a po usušení byly spočítány plaky. Počty plaků byly převedeny na množství virových částic, které jsou schopné tvořit plaky (PFU/ml).

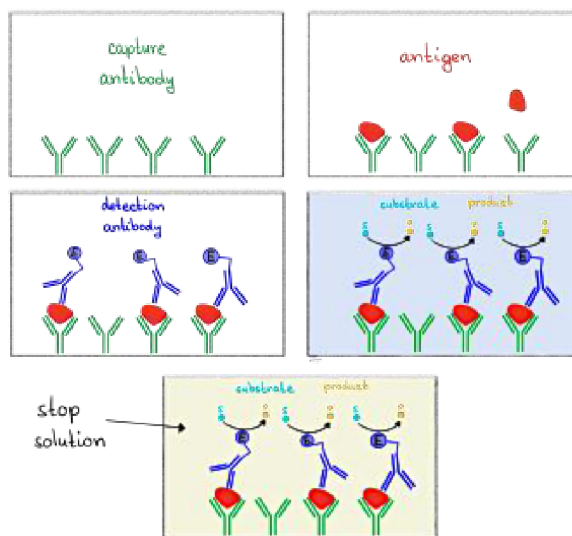
Tab. VI: Chemikálie použité k plakové titraci.

Chemikálie	Výrobce/ dodavatel
CMC	Sigma-Aldrich
2x koncentrované DMEM médium	Biosera
NaCl	Penta
Naftalenová čern v kyselině octové	Serva

### 3.2.6. ELISA

Metoda ELISA byla použita ke zjištění přítomnosti a koncentrace interferonů ve vzorcích odebraných 1dpi a 2dpi ve třech multiplicitách viru (MOI=0,1, 1 a 10) bez přítomnosti slin/SGE. ELISA byla předběžně provedena pouze s jednou kopií vzorku pro každý interferon, aby se zjistilo, zda keratinocyty interferon vůbec produkují.

V obou případech se jedná o sendvičovou ELISU s přímou detekcí, jejíž princip je schematicky vysvětlen na obrázku 6.



Obr. 12: Sendvičová ELISA s přímou detekcí. Na povrch jamky jsou navázány záchytové protilátky, na které se specificky váže antigen. Poté je přidána detekční protilátka (konjugát), která se váže na zachycený antigen. Po inkubaci a promytí je přidán substrát a dochází k barevné změně (čtvrtá jamka). Nakonec je přidáno stop solution, čímž dochází k zastavení reakce a další barevné změně (vlastní ilustrace).

### 3.2.6.1. IL-28B (IFN lambda 3) ELISA

První den byla do příslušného počtu jamek v panelu nanášena záchytná protilátka v množství 100ul/ jamku ředěná dle pokynů v návodu. Panel byl přelepen fólií a inkubován přes noc v lednici při 4 °C. Zároveň byl připraven i promývací roztok (1x PBS, 0,05% Tween). Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce VII.

Následující den byl nejdříve připraven ELISA/ELISPOT Diluent dle pokynů v návodu. Obsah jamek byl odsát a 5x promyt předchozí den připraveným promývacím roztokem. Do každé jamky bylo nanášeno 200ul ELISA/ELISPOT Diluent, panel byl přelepen fólií a inkubován při laboratorní teplotě 1 hodinu. V průběhu inkubace byl rekonstituován standard přidáním destilované vody pomocí injekční stříkačky do zkumavky s lyofilizovaným IFN-28B. Koncentrace takto připraveného standardu byla 4000 pg/ml.

Po ukončení inkubace byl obsah jamek třikrát promyt promývacím roztokem. Kalibrační řada i vzorky byly na panel nanášeny v duplikacích. Do jamek B1/2 – H1/2 bylo nanášeno 100ul ELISA/ELISPOT Diluentu. Do jamek A1/2 bylo přidáno 200ul rekonstituovaného standardu a bylo provedeno ředění dvojkovou ředící řadou k vytvoření kalibrační řady. Následně bylo do jamek A3/4 – F3/4 nanášeno 50ul ELISA/ELISPOT Diluentu a 50ul vzorku. Jamky G3 a H3 obsahovaly 100ul ELISA/ELISPOT Diluent a sloužily jako blank. Takto připravený panel byl přelepen fólií a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin.

V průběhu inkubace byla nařaděna detekční protilátka dle pokynů v návodu. Po uplynutí času inkubace byl obsah jamek pětkrát promyt promývacím roztokem. Následně bylo přidáno 100ul/ jamku detekční protilátky, panel byl opět přelepen fólií a inkubován při laboratorní teplotě 1 hodinu.

Dále bylo provedeno promytí a byl přidán konjugát Avidin-HRP v množství 100ul/ jamku a po 30 minutové inkubaci s následným promytím také substrát TMB (tetramethylbenzidine) ve stejném množství. Takto byl panel inkubován ve tmě po dobu 15 minut, načež bylo přidáno stop solution k zastavení reakce v množství 100ul/jamku.

Absorbance byla odečtena při vlnových délkách 450nm a 570nm.

*Tab. VII: Použité chemikálie a ELISA kit.*

<b>Chemikálie/ kit</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
Tween	Sigma-Aldrich
Mouse IL-28B (IFN lambda 3) Uncoated ELISA	Invitrogen

### 3.2.6.2. *IFN-β ELISA*

V prvním kroku byl rekonstituován standard přidáním 4,8ml Assay Buffer A do zkumavky s lyofilizovaným IFN-β. Ve zkumavkách byla poté podle návodu naředěna kalibrační řada dvojkovým ředěním tak, že nejvyšší koncentrace měla hodnotu 500 pg/ml a nejnižší 7,8 pg/ml.

Jamky byly nejdříve pětkrát promyty promývacím roztokem, který byl součástí kitu. Do všech jamek, s výjimkou jamek blanku, bylo nanášeno 50ul Assay Buffer A a 50ul kalibračních roztoků nebo vzorků. Kalibrační řada i vzorky byly hodnoceny v duplikacích. Jako blank sloužily jamky H1/2, do kterých bylo přidáno 100ul Assay Buffer A. Panel byl poté překryt fólií a inkubován při laboratorní teplotě 2 hodiny.

Po uplynutí doby inkubace byly jamky pětkrát promyty a do každé bylo nanášeno 100ul detekční protilátky. Následovala opět dvouhodinová inkubace při laboratorní teplotě.

Jamky byly promyty a byl přidán konjugát Avidin-HRP v objemu 100ul/ jamku. Po 30 minutové inkubaci byl obsah jamek odsát, promyt a byl nanášen substrát (Substrate solution F) ve stejném objemu. Panel byl inkubován ve tmě po dobu 30 minut. Následovalo přidání 100ul/ jamku stop solution pro zastavení reakce.

Absorbance byla odečtena při vlnových délkách 450nm a 570nm.

*Tab. VIII: Použité chemikálie a ELISA kit.*

<b>Chemikálie/ kit</b>	<b>Výrobce/ dodavatel</b>
LEGEND MAX™ ELISA Kit with Pre-coated Plates Mouse IFN-β	BioLegend®

### 3.2.7. Stanovení antivirového efektu IFN-lambda a IFN-beta na infekci keratinocytů TBEV, stanovení efektu klíštěcích slin

Ke stanovení protivirového efektu interferonů a efektu klíštěcích slin byla použita primární kultura keratinocytů kultivována po dobu 10 dní na 96j panelu. Keratinocyty byly nejdříve zkontrolovány pod mikroskopem a následně bylo z jamek odsáto 180ul média a přidáno 100ul růstového média s TBEV (MOI=10). Infikované buňky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

V průběhu inkubace byly naředěny klíštěcí sliny. Byla použita zásobní koncentrace klíštěcích slin 450ug/ ml, která byla v růstovém médiu pro keratinocyty naředěna na 20ug/ ml.



Po ukončení inkubace keratinocytů s TBEV byl obsah jamek dvakrát promyt růstovým médiem a do příslušných jamek bylo přidáno 100ul naředěných klišťecích slin. Zbytek jamek byl doplněn 100ul čistého růstového média. Následovala inkubace po dobu 2 hodin za stejných podmínek.

Poté byl do příslušných jamek přidán interferon – a to buď IL-28B nebo IFN- $\beta$  v koncentraci 200U/ml. Lyofilizované interferony byly rekonstituovány v roztoku PBS s 1% bovinním sérem a naředěny na požadovanou koncentraci v růstovém médiu pro keratinocyty. Do příslušných jamek bylo nanášeno 100ul, jamky bez interferonu byly doplněny čistým médiem ve stejném objemu. Následovala inkubace panelu po dobu 48 hodin. Poté byl z jamek odebrán supernatant v množství 150ul a titry viru byly stanoveny metodou plakové titrace.

### 3.2.8. Statistické vyhodnocení dat

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program GraphPad Prism 10. Část výsledků byla hodnocena pomocí dvoucestné ANOVY a část párovým t-testem. Statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami tak, že jedna hvězdička značí  $p < 0,05$ , dvě hvězdičky  $p < 0,01$  a tři hvězdičky  $p < 0,001$ . Výsledky v grafech představují logaritmy aritmetických průměrů hodnot a chybové úsečky zobrazují střední chybu průměru (SEM).

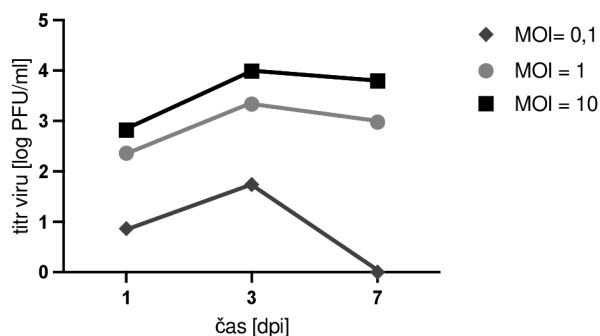
## 4. Výsledky

### 4.1. Replikace viru klišťové encefalitidy v myších keratinocytech

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda a jak se virus klišťové encefalitidy replikuje v primárně kultuře myších keratinocytů. Získané keratinocyty byly po vytvoření konfluentní vrstvy infikované TBEV ve třech různých multiplicitách a ponechány v inkubátoru při stabilní teplotě. Vzorky byly odebírány v různých časových intervalech a byly prováděny vždy v triplikacích. Titr viru byl následně stanoven metodou plakové titrace na buňkách A549.

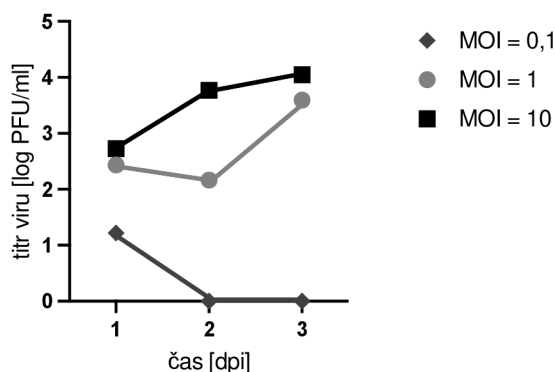
V prvním pokusu byly vzorky sbírané v časových intervalech 1dpi, 3dpi a 7dpi. Byly použity tři infekční dávky, a to  $MOI=0,1$ ,  $1$  a  $10$ . Z obrázku 13 lze vyčíst, že nejvyšších titrů dosahoval virus ve třetím dni po infekci. Poté se množství viru snižuje. Graf zobrazuje aritmetické průměry naměřených hodnot.





Obr. 13: Replikace TBEV v myších keratinocytech při multiplicitách TBEV 0,1, 1 a 10.

V dalších pokusech byly vzorky hodnocené v časových intervalech 1dpi, 2dpi a 3dpi. Tento pokus byl opakován dvakrát, každý vzorek vždy v triplikacích. Graf zobrazuje aritmetické průměry naměřených hodnot. Byly použity stejné infekční dávky jako u předchozího měření. Z obrázku 14 je patrné, že nejvyšší množství viru bylo detekováno opět ve třetím dni po infekci. U multiplicity 0,1 byl virus detekován pouze první den po infekci, v časech 2dpi a 3dpi nebyly přítomny žádné plaky. V čase 2dpi je mezi infekčními dávkami viru zřetelný rozdíl, který v čase 3dpi mezi multiplicitami 1 a 10 téměř mizí.

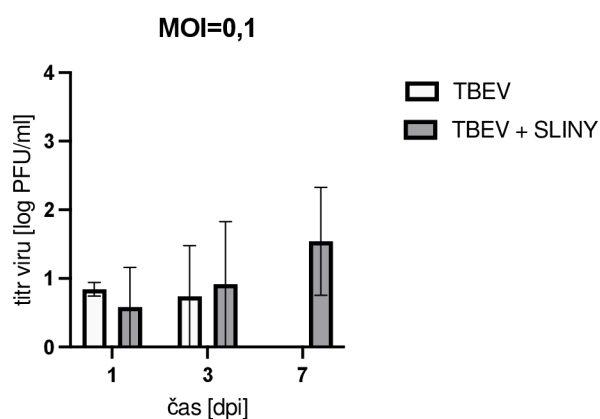


Obr. 14: Replikace TBEV v myších keratinocytech při multiplicitách TBEV 0,1, 1 a 10.

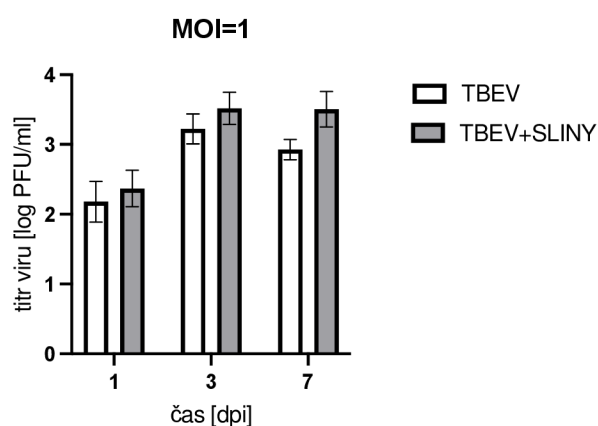
#### 4.2. Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech

V tomto pokusu byly použity klíštěcí sliny získané ze samic klíštěte *Ixodes ricinus* sajících na morčatech po dobu šesti dní. Keratinocyty byly kultivovány na 96j panelu a byly rozděleny do dvou skupin: s klíštěcími slinami a bez slin. Byl pozorován vliv slin s koncentrací proteinu 20ug/ml na infekci myších keratinocytů virem klíšťové encefalitidy. Všechny vzorky byly prováděné v triplikacích. Replikace viru byla pozorována ve třech časových intervalech: 1dpi, 3dpi a 7dpi. Množství viru v odebraných vzorcích bylo následně vyhodnoceno metodou plakové titrace na buňkách A549. Byly použity tři multiplicity viru.

U infekčních dávek MOI=0,1 (obrázek 15) a MOI=1 (obrázek 16) je patrné zvýšení množství viru v časech 3dpi a 7 dpi. Zvýšení virové replikace bylo pozorováno i v prvním dni po infekci u multiplicity viru 1, nicméně u multiplicity 0,1 byl efekt opačný. U infekční dávky viru MOI=1 zvyšovaly sliny replikaci TBEV v keratinocytech průměrně 2,7krát (aritmetický průměr zvýšení všech tří časových intervalů).

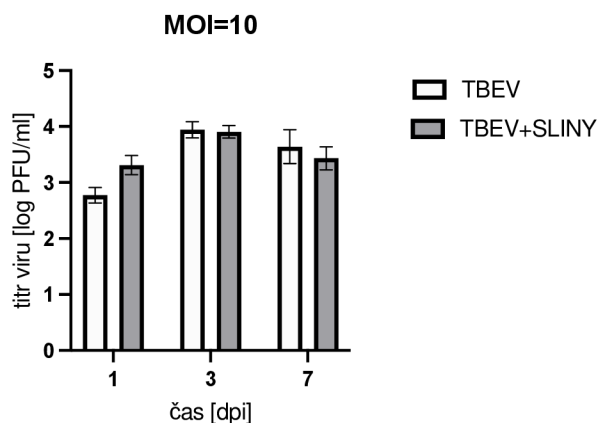


Obr. 15: Vliv klišťecích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 0,1.



Obr. 16: Vliv klišťecích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 1.

U multiplicity viru 10 byla replikace TBEV v keratinocytech zvýšená pouze v čase 1dpi. V časech 3dpi a 7dpi byl efekt na množství viru opačný. Výsledky zobrazuje obrázek 17.

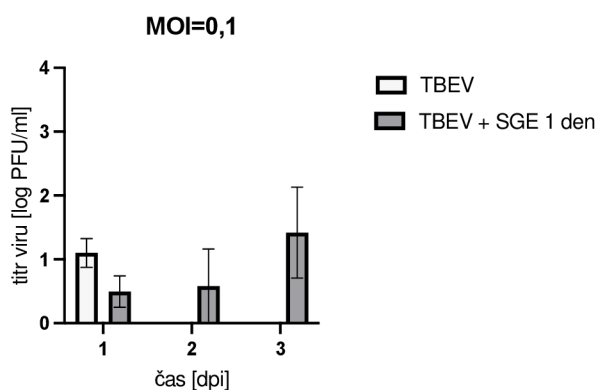


Obr. 17: Vliv klišťecích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 10.

#### 4.3. Vliv extraktu ze slinných žláz na replikaci TBEV v keratinocytech

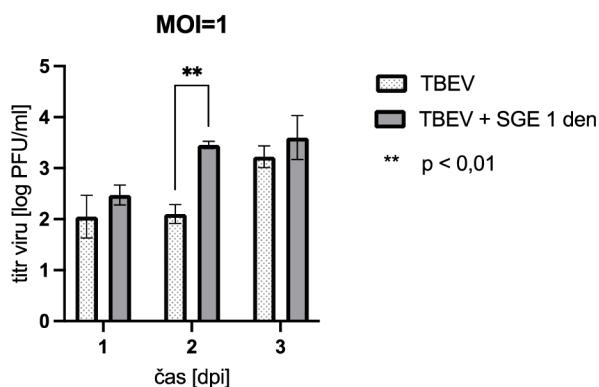
Tento pokus byl proveden s extraktem ze slinných žláz klišťat. Slinné žlázy byly získané ze samic klišťete *Ixodes ricinus* sajících na morčatech po dobu jednoho, třech a šesti dní. Slinné žlázy byly vypitvány z klišťat pod binolupou, zhomogenizovány a použity v pokusu v koncentraci proteinu 20ug/ml. Vzorky byly prováděny vždy v triplikacích, byly použity tři infekční dávky a titr viru byl stanoven metodou plakové titrace na buňkách A549.

V prvním pokusu bylo použito SGE z klišťat sajících po dobu jednoho dne. Vzorky byly hodnoceny ve třech časových intervalech, a to 1dpi, 2dpi a 3dpi. U všech infekčních dávek viru můžeme pozorovat trend zvýšení množství viru v keratinocytech. Opačný efekt byl detekován pouze u multiplicity viru 0,1 v prvním dni po infekci. Ve druhém a třetím dni po infekci u stejné infekční dávky nebyly ve vzorcích bez klišťecích slin pozorovány žádné plaky (obrázek 18).



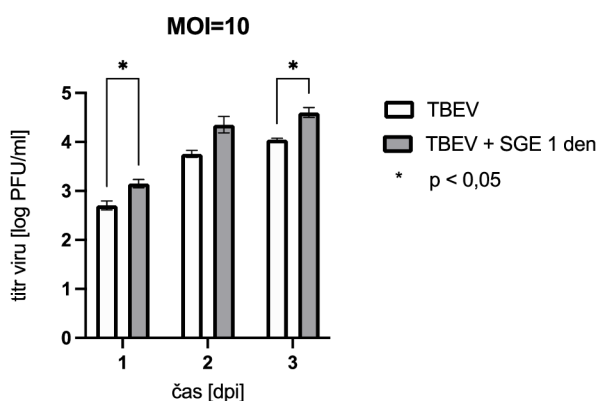
Obr. 18: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klišťat sajících jeden den na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 0,1.

U infekční dávky MOI=1 bylo zvýšení replikace TBEV zjištěno ve všech časových intervalech. V čase 2dpi byl rozdíl statisticky významný ( $p=0,01$ ) a množství viru bylo téměř 20krát vyšší v přítomnosti klíštěcích slin. V prvním dni po infekci bylo množství viru ve vzorku s klíštěcími slinami zvýšeno 1,3krát a ve třetím dni 1,8krát (obrázek 19).



Obr. 19: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících jeden den na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 1.

Při multiplicitě viru 10 bylo také pozorováno zvýšení titru viru ve všech časových intervalech. V časech 1dpi ( $p=0,0237$ ) a 3dpi ( $p=0,0224$ ) byl rozdíl statisticky významný. Množství viru bylo u buněk s přidávanými klíštěcími slinami 2,7krát vyšší v čase 1dpi, 4,3krát vyšší v čase 2dpi a 3,8krát vyšší v čase 3dpi oproti kontrolním keratinocytům bez slin (obrázek 20).

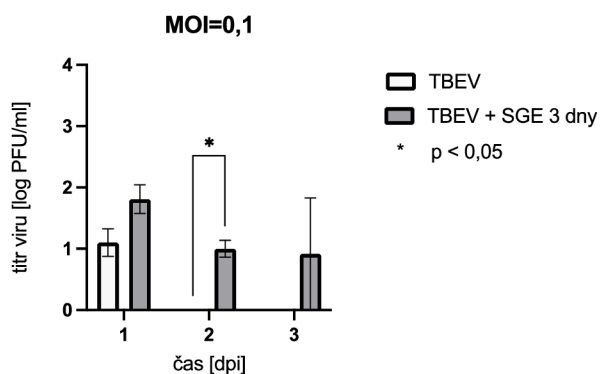


Obr. 20: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících jeden den na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 10.

Ve druhém pokusu byl použit extrakt ze slinných žláz získaný z klíšťat sajících na morčatech po dobu tří dnů. Keratinocyty byly opět rozděleny na dvě skupiny: kontrolní

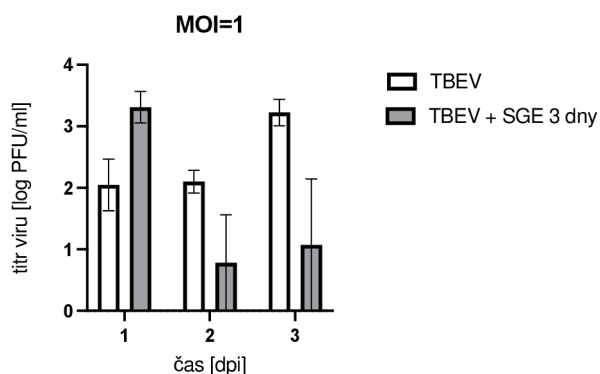
skupina bez SGE a skupina, ke které byl přidán extrakt ze slinných žláz. Byly použity tři multiplicity viru a vzorky byly sbírány v časech 1dpi, 2dpi a 3dpi.

Pozitivní efekt SGE ve všech časových intervalech byl pozorován při MOI=0,1. V čase 1dpi byl titr viru zvýšen téměř 5krát v keratinocytech ovlivněných SGE. V čase 2dpi bylo množství viru 11krát vyšší a byla prokázána statistická významnost ( $p=0,0189$ ). Výsledky zobrazuje obrázek 21.

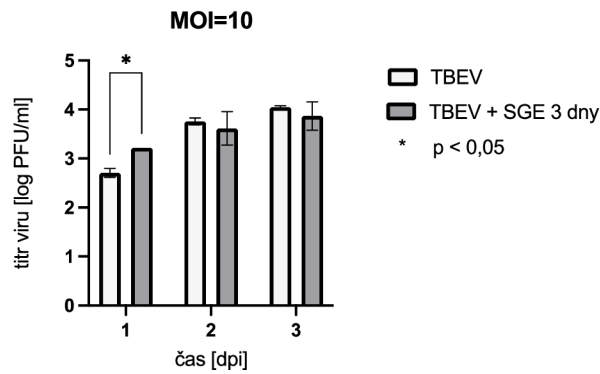


Obr. 21: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klišát sajících tři dny na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 0,1.

Při infekčních dávkách TBEV MOI=1 (obrázek 22) a MOI=10 (obrázek 23) bylo zvýšené množství viru v keratinocytech ovlivněných SGE pozorováno pouze v prvním dni po infekci. Při multiplicitě viru 1 byl titr viru v čase 1dpi zvýšen 10krát a při MOI=10 byla prokázána statistická významnost ( $p=0,0309$ ) a zvýšení množství viru oproti kontrolní skupině bylo trojnásobné. V časech 2dpi a 3dpi byl efekt extraktu ze slinných žláz u obou infekčních dávek opačný.



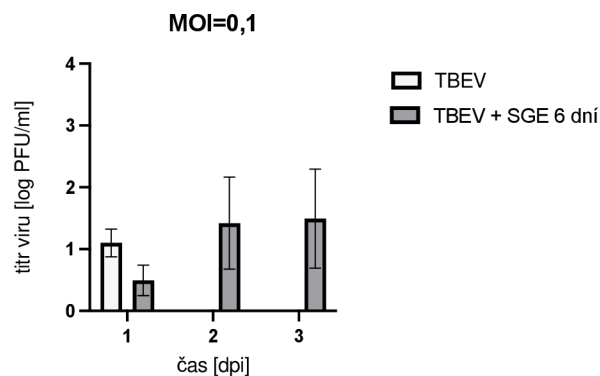
Obr. 22: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klišát sajících tři dny na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 1.



Obr. 23: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících tři dny na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 10.

V posledním pokusu této série byl použit extrakt ze slinných žláz z klíšťat sajících po dobu šesti dní. Stejně jako u předchozích pokusů byly keratinocyty infikovány třemi multiplicitami TBEV a vzorky byly hodnoceny ve třech časových intervalech.

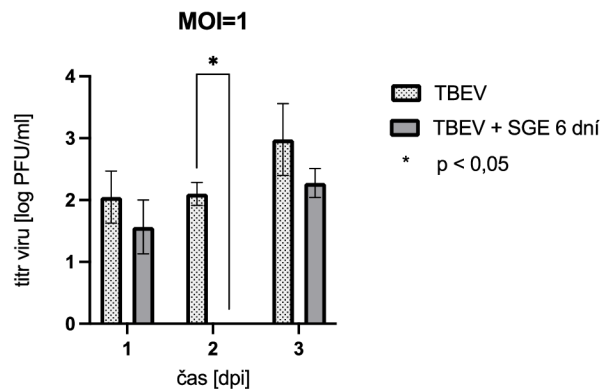
U multiplicity viru 0,1 bylo vyhodnoceno zvýšení titru viru v časech 2dpi a 3dpi. Vzorky bez přidaného extraktu ze slinných žláz v těchto časových intervalech nevykazovaly žádné plaky. V čase 1dpi byl pozorován opačný efekt, titr viru kontrolní skupiny byl 4,5krát vyšší (obrázek 24).



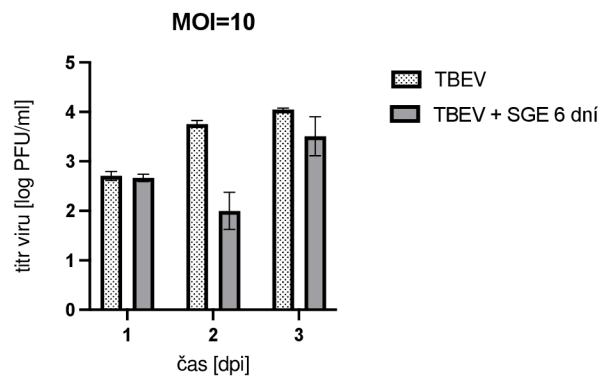
Obr. 24: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících šest dní na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 0,1.

Při infekčních dávkách viru MOI=1 (obrázek 25) a MOI=10 (obrázek 26) byl efekt SGE ve všech časových intervalech opačný. Ve druhém dni po infekci při multiplicitě 1 nebyly zaznamenány žádné plaky u vzorku s přidavkem SGE a rozdíl byl statisticky významný ( $p=0,0225$ ).





Obr. 25: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících šest dní na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 1.

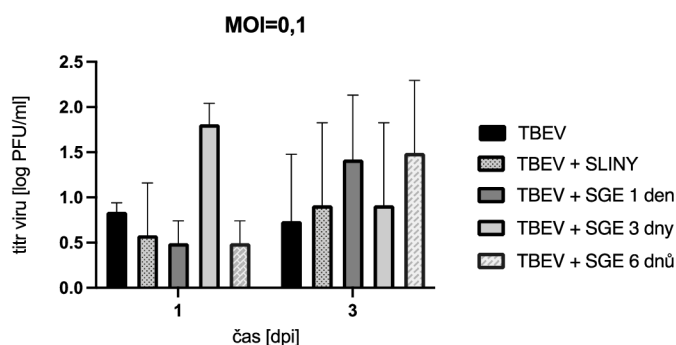


Obr. 26: Vliv extraktu ze slinných žláz získaného z klíšťat sajících šest dní na replikaci TBEV v keratinocytech při multiplicitě viru 10.

#### 4.4. Porovnání replikace TBEV v keratinocytech pod vlivem klíštěcích slin a SGE

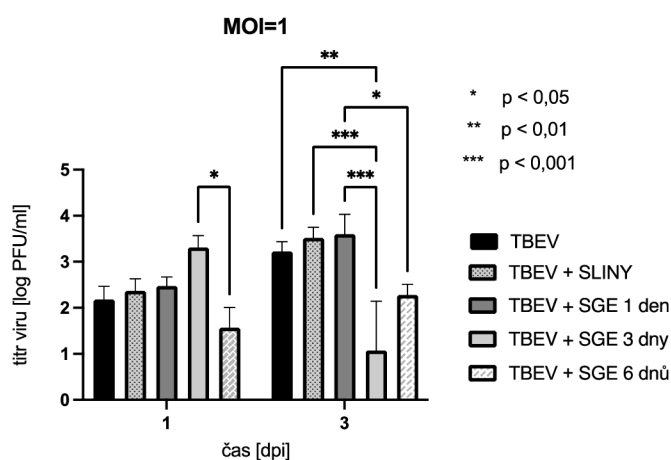
Vyhodnocené titry viru z předchozí série pokusů byly porovnány ve třech multiplicitách 0,1, 1 a 10 v časových intervalech 1dpi a 3dpi. Klíštěcí sliny i extrakty ze slinných žláz z klíšťat sajících 1, 3 a 6 dní byly použity v koncentraci proteinu 20ug/ml. Vzorky byly vždy provedeny v triplicacích s kontrolními skupinami bez slin nebo SGE.

V infekční dávce viru MOI=0,1 v čase 1dpi byl nejvyšší naměřený titr viru vzorek s přidaným SGE z klíšťat sajících tři dny, a to 22krát vyšší než množství viru ve vzorku s SGE z klíšťat sajících jeden a šest dní, 5krát vyšší než vzorek s klíštěcími slinami a 2krát vyšší než kontrolní vzorek bez slin/SGE. V čase 3dpi dosahovaly nejvyšších titrů vzorky s SGE z klíšťat sajících šest dní a jeden den. Nejnižší množství viru bylo v kontrolním vzorku bez přídavku slin/SGE (obrázek 27).



Obr. 27: Porovnání vlivu klišťecích slin a extraktu ze slinných žláz na replikaci TBEV v myších keratinocytech v multiplicitě viru 0,1.

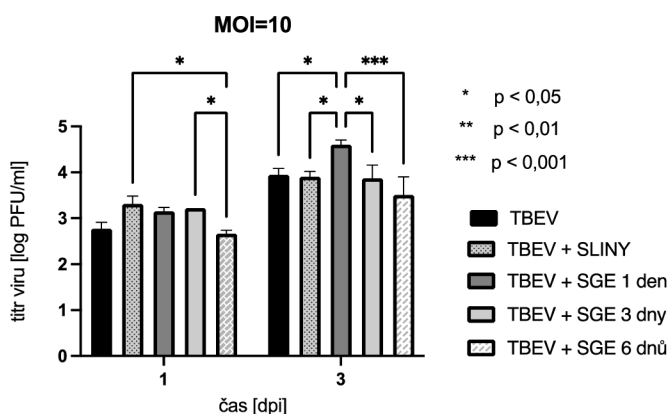
U multiplicity viru 1 (obrázek 28) vykazoval nejvyšší titer viru v čase 1dpi taktéž vzorek s SGE z klišťat sajících tři dny. Byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v porovnání se vzorkem s SGE z klišťat sajících šest dní ( $p=0,0109$ ). Titer viru byl zvýšen 9,5krát v porovnání s množstvím viru ve vzorcích s SGE z klišťat sajících jeden den, klišťecími slinami s kontrolním vzorkem bez přídavku slin/SGE (aritmetický průměr jmenovaných vzorků). V čase 3dpi (obrázek 28) byl nejvyšší titer viru ve vzorku s přídavkem SGE z klišťat sajících jeden den. Tento vzorek prokazoval statistickou významnost se vzorky inkubovanými s SGE získaným z klišťat sajících po dobu tří dnů ( $p=0,0006$ ) a SGE z šest dní sajících klišťat ( $p=0,0457$ ). Druhého nejvyššího titru dosahoval vzorek s přídavkem klišťecích slin, který prokazoval statistickou významnost v porovnání se vzorkem s SGE ze tří dnů sajících klišťat ( $p=0,0008$ ) a třetí nejvyšší titer TBEV byl naměřen u kontrolního vzorku bez slin/SGE, který byl signifikantní v porovnání se vzorkem s SGE z klišťat sajících tři dny ( $p=0,0025$ ).



Obr. 28: Porovnání vlivu klišťecích slin a extraktu ze slinných žláz na replikaci TBEV v myších keratinocytech v multiplicitě viru 1.

V čase 1dpi u multiplicity viru 10 dosáhl nejvyššího titru vzorek s klišťecími slinami, a to 4,8krát vyšší než vzorek s SGE z šest dní sajících klišťat, který byl naopak nejnižší. Byla zde prokázána statistická významnost ( $p=0,023$ ). Druhý nejvyšší titr měl vzorek s SGE z jeden den sajících klišťat, který byl 3krát vyšší než vzorek s SGE z šest dní sajících klišťat a také zde byla prokázána statistická významnost ( $p=0,0477$ ).

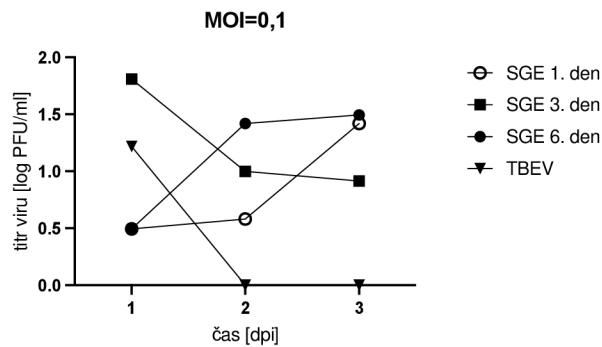
V čase 3dpi dosáhl nejvyššího množství viru vzorek s SGE z klišťat sajících po dobu jednoho dne, který byl 7,4krát vyšší než titr vzorku s SGE z šestého dne sání ( $p=0,0005$ ), 4,9krát vyšší než titr viru ve vzorku s klišťecími slinami ( $p=0,0148$ ), 4,3krát vyšší než titr kontrolního vzorku ( $p=0,0201$ ) a 3,6krát vyšší než titr ve vzorku s SGE z klišťat sajících tři dny ( $p=0,0107$ ). Výsledky porovnává obrázek 29.



Obr. 29: Porovnání vlivu klišťecích slin a extraktu ze slinných žláz na replikaci TBEV v myších keratinocytech v multiplicitě viru 10.

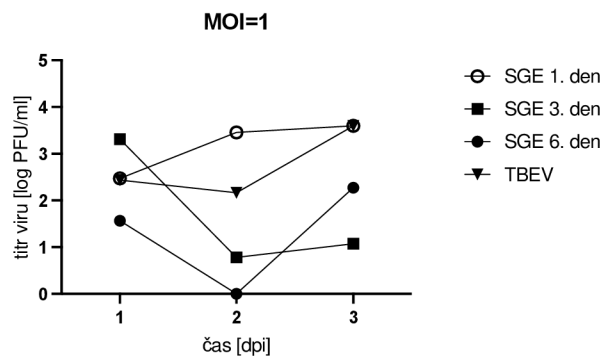
Dále byly porovnávány titry virů ze vzorků s přidáním SGE z klišťat sajících po různé dlouhou dobu s kontrolním vzorkem bez přídavku slin či SGE.

Obrázek 30 zobrazuje multiplicitu viru 0,1. V prvním dni po infekci dosáhl nejvyššího titru vzorek s přídavkem SGE z klišťat sajících tři dny. Druhý nejvyšší byl kontrolní vzorek. U obou se ovšem množství viru v dalších dnech měření snižovalo. Naopak vzorky dosahující nižších titrů v prvním dni vykazovaly vyšší replikaci viru a nejvyšší množství viru v nich bylo naměřeno třetí den po infekci.



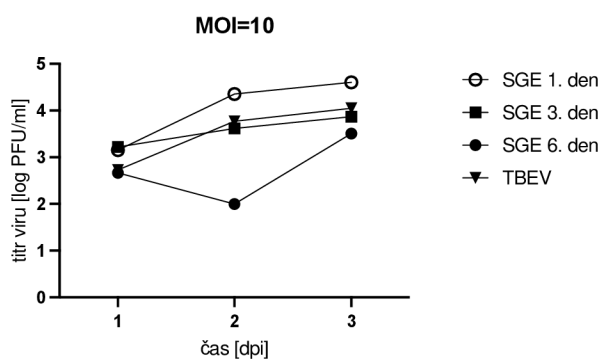
Obr. 30: Porovnání vlivu SGE z různých dní a kontrolního vzorku při  $MOI=0,1$ .

U infekční dávky viru 1 (obrázek 31) opět dosahoval nejvyššího titru v prvním dni vzorek s SGE z klíšťat sajících po dobu tří dnů. Nárůst množství viru mezi prvním a druhým dnem po infekci byl pozorován pouze u vzorku s SGE z klíšťat sajících jeden den, nicméně pozitivní rozdíl mezi druhým a třetím dnem byl naměřen u všech vzorků. Nejvyšších titrů viru ve třetím dni po infekci dosahoval vzorek s SGE z prvního dne sání a kontrolní vzorek.



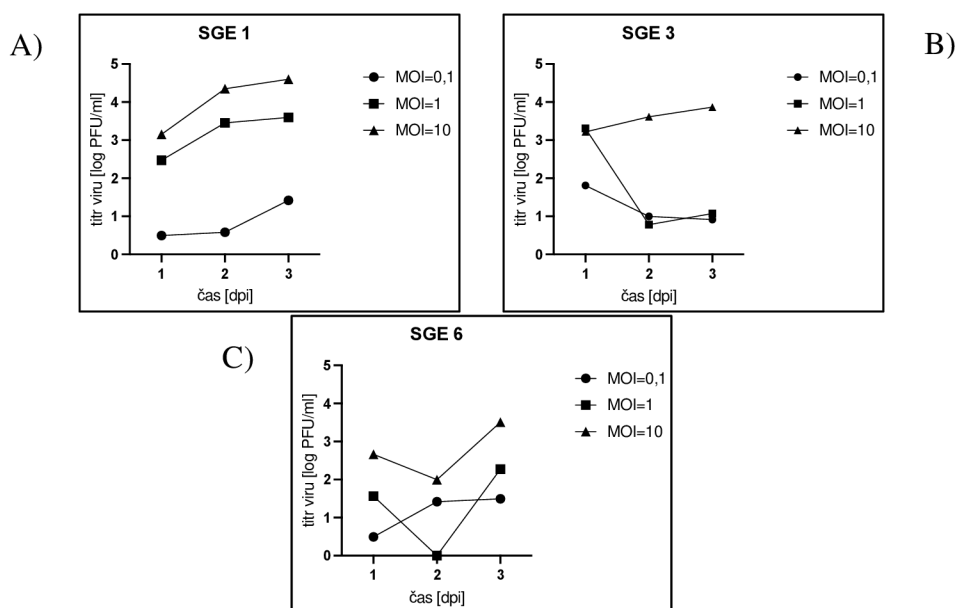
Obr. 31: Porovnání vlivu SGE z různých dní a kontrolního vzorku při  $MOI=1$ .

Při  $MOI=10$  (obrázek 32) bylo naměřeno snížení množství viru mezi prvním a druhým dnem pouze u vzorku s SGE z klíšťat sajících šest dní. Mezi druhým a třetím dnem vzrostl titr viru u všech hodnocených vzorků. Nejvyššího titru ve třetím i druhém dni dosáhl vzorek s SGE z klíšťat sajících jeden den, druhým byl kontrolní vzorek a třetím SGE ze třetího dne sání. Nejnižší titry ve všech měřených časových intervalech byly zjištěny u vzorku s SGE z klíšťat sajících šest dní.



Obr. 32: Porovnání vlivu SGE z různých dní a kontrolního vzorku při  $MOI=0,1$ .

Na obrázku 33 je zobrazeno porovnání změn v titrech viru mezi rozdílnými multiplicitami v časových intervalech 1dpi, 2dpi a 3dpi. Vzorky s extraktem ze slinných žláz z klíšťat sajících jeden den (obrázek 33A) vykazovaly růst titru viru ve všech multiplicitách mezi jednotlivými dny. Z předchozích grafů (obrázek 18-21) je také patrné, že pouze u SGE z prvního dne byly pozorovány vyšší titry TBEV než u kontrolních vzorků ve dnech 2dpi a 3dpi u všech infekčních dávek. U vzorků s extraktem ze slinných žláz z klíšťat sajících tři dny (obrázek 33B) a SGE z klíšťat sajících šest dní (obrázek 33C) bylo pozorováno snížení titru viru při  $MOI=1$  mezi prvním a druhým dnem po infekci. Jedinými vzorky s SGE ze šestého dne, které dosáhly vyššího titru, než vzorek kontrolní byly vzorky odebrané v čase 2dpi a 3dpi při multiplicitě 0,1 (obrázek 24). Vzorky s SGE ze třetího dne sání měly vždy vyšší titry než vzorky kontrolní v čase 1dpi, v čase 2dpi a 3dpi bylo zvýšení pozorováno pouze u  $MOI=0,1$ .



Obr. 33: Porovnání infekčních dávek viru v časových intervalech 1dpi, 2dpi a 3dpi u vzorků s přidavkem extraktu ze slinných žláz z klíšťat sajících jeden den (A), tři dny (B) a šest dní (C).

#### 4.5. ELISA

V dalším pokusu byla stanovena hladina IFN- $\lambda$  (tabulka IX) a IFN- $\beta$  (tabulka X) metodou ELISA ze vzorků odebraných z infikovaných keratinocytů. Pro měření byly vybrány vzorky odebrané v časech 1dpi a 2dpi ve všech použitých multiplicitách viru.

Interferon  $\lambda$  byl detekován ve všech hodnocených vzorcích v různých hladinách. Koncentrace IFN- $\lambda$  byla nejvyšší v prvním dni po infekci při MOI=0,1, druhou nejvyšší koncentraci dosahoval vzorek odebraný dva dny po infekci při stejné infekční dávce viru. Nejméně IFN- $\lambda$  bylo detekováno ve vzorku v čase 1dpi při MOI=10.

Tab. IX: Výsledné hodnoty IFN- $\lambda$  v časových intervalech 1dpi a 2dpi při MOI= 0,1, 1 a 10.

IFN- $\lambda$	
vzorek	koncentrace pg/ml
24hpi, MOI= 0,1	125
24hpi, MOI= 1	59,1
24hpi, MOI= 10	55
48hpi, MOI=0,1	108,5
48hpi, MOI=1	62
48hpi, MOI= 10	78,1

Interferon  $\beta$  byl také přítomný ve všech hodnocených vzorcích. Nejvyšších hladin opět dosahovaly vzorky s infekční dávkou viru MOI=0,1, a to 245,4 pg/ml po dvou dnech od infekce a 100,2 pg/ml po prvním dni infekce.

Tab. X: Výsledné hodnoty IFN- $\beta$  v časových intervalech 1dpi a 2dpi při MOI=0,1, 1 a 10.

IFN- $\beta$	
vzorek	koncentrace pg/ml
24hpi, MOI= 0,1	100,2
24hpi, MOI= 1	66,7
24hpi, MOI= 10	74,3
48hpi, MOI=0,1	245,4
48hpi, MOI=1	76,9
48hpi, MOI= 10	67,6

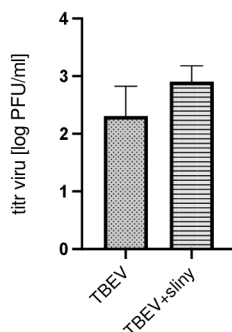
#### 4.6. Protivirový efekt interferonů na infekci TBEV keratinocytů, vliv klišťecích slin

V poslední sérii pokusů byl zjišťován efekt interferonů  $\beta$  a  $\lambda$  na ochranu keratinocytů před infekcí TBEV. Zároveň byl pozorován vliv klišťecích slin na protektivní funkci interferonů.



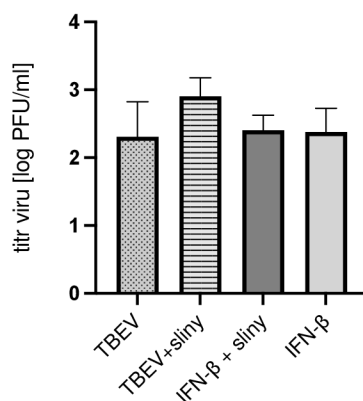
Vzorky byly provedeny v triplikacích, sliny byly použity v koncentraci proteinu 20ug/ ml, interferony v koncentraci 200U/ ml, multiplicita viru byla 10 a vzorky byly vyhodnoceny dva dny po infekci. Titry viru byly stanoveny metodou plakové titrace na buňkách A549.

Obrázek 34 ukazuje srovnání titru viru kontrolního vzorku bez klíštěcích slin a vzorku se slinami. Je patrná zvýšená replikace TBEV pod vlivem klíštěcích slin, ale rozdíl nebyl vyhodnocen jako signifikantní.



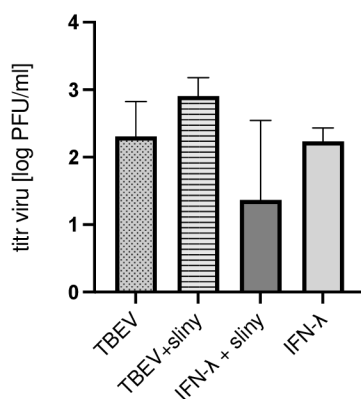
Obr. 34: Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech v čase 2dpi, MOI=10.

Dále byl hodnocen vliv interferonu  $\beta$  na replikaci TBEV v keratinocytech a vliv klíštěcích slin. Mezi sebou byly srovnávány čtyři vzorky – kontrolní vzorek, infekce s klíštěcími slinami, infekce pouze s interferonem  $\beta$  a vzorek se slinami i s interferonem  $\beta$ . Z obrázku 35 je patrné, že IFN- $\beta$  nesnížil ani nezvýšil replikaci TBEV v keratinocytech, stejně tak klíštěcí sliny neovlivňovaly replikaci viru, když byly přidány do vzorků s IFN- $\beta$ . Oproti ostatním vzorkům je vyšší pouze titer s přidavkem klíštěcích slin bez interferonu.



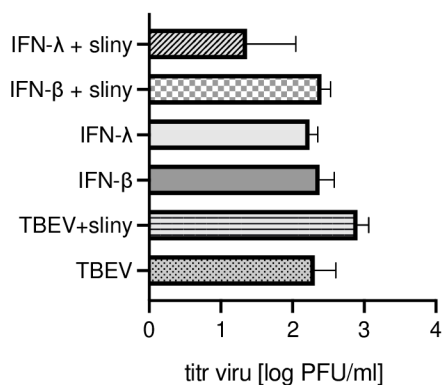
Obr. 35: Porovnání titru viru kontrolního vzorku bez klíštěcích slin a vzorku s IFN- $\beta$  (A); porovnání vzorku s klíštěcími slinami a slinami společně s IFN- $\beta$  (B); srovnání infekce s IFN- $\beta$  a vzorku infekce s interferonem  $\beta$  spolu s klíštěcími slinami (C).

Z obrázku 36 můžeme vyčíst, že vzorek s IFN- $\lambda$  je téměř shodný s titrem viru kontrolního vzorku. Vzorek, který byl ovlivněn klišťecími slinami dohromady s interferonem  $\lambda$  vykazoval vůbec nejnižší titer viru ze všech testovaných vzorků, a to 2,5 krát nižší než vzorek s interferonem  $\lambda$  a 12,5 krát nižší než vzorek s klišťecími slinami.



Obr. 36: Porovnání titru viru kontrolního vzorku bez klišťecích slin a vzorku s IFN- $\lambda$  (A); porovnání vzorku s klišťecími slinami a slinami společně s IFN- $\lambda$  (B); srovnání infekce s IFN- $\lambda$  a vzorku infekce s interferonem  $\lambda$  spolu s klišťecími slinami (C).

Poslední graf zobrazuje srovnání titrů viru všech vzorků z této série pokusů. Z obrázku 37 je patrné, že nejvyšší množství viru bylo naměřeno u vzorku s klišťecími slinami a nejnižších hodnot dosahoval titer viru vzorku ovlivněném IFN- $\lambda$  a slinami.



Obr. 37: Srovnání titrů vzorků ovlivněných klišťecími slinami a interferony  $\lambda$  a  $\beta$ .

## 5. Diskuze

Virus klíšťové encefalidity je jedním z nejrozšířenějších zástupců rodu *Flavivirus* napříč Evropou a Asií. Většina flavivirů jsou arboviry přenášené hematofágními členovci a využívající farmakologicky aktivních molekul slin k usnadnění své transmise a diseminace v hostiteli. Vektorem TBEV jsou klíšťata čeledi *Ixodidae*. Klíšťata se mohou virem nakazit sáním na infikovaném hostiteli, transovariálně anebo při krmení více klíšťat na jednom hostiteli (Růžek et al. 2010, Pustijanac et al. 2023). Místo sání klíštěte na kůži hostitele je kritickým rozhraním mezi hostitelem, klíštětem a patogeny přenášenými v klíštěcích slinách a je vysoce modifikováno farmakologicky aktivními molekulami ve slinách klíštěte. Pro patogeny je to privilegovaná nika, kterou množství z nich využívá k usnadnění své transmise, replikace a diseminace a také jako úkryt před imunologickým dohledem hostitele, který by mohl patogen odstranit v brzkých stádiích infekce. Tento proces je označován jako slinami aktivovaná (asistovaná) transmise (SAT) - nepřímá podpora přenosu patogenů přenášených klíšťaty prostřednictvím působení bioaktivních molekul slin klíšťat na hostitele z řad obratlovců (Nuttall & Labuda 2004). Pravděpodobně neexistuje pouze jeden SAT faktor podporující přenos patogenů, ale celá řada molekul, které se navíc v průběhu sání mění. Pro klíšťata je kooperativní slinná aktivita jediným způsobem, jak mohou překonat redundanci v ochranných systémech hostitele v míře, která jim umožní plné nasátí, což zamezí potřebě hledání dalšího hostitele. Toto tvrzení podporuje i fakt, že klíšťata často sají na hostitelích velmi blízko u sebe, čímž dochází ke sdílení individuálního složení klíštěcích slin a také k přenosu patogenů mezi infikovanými a neinfikovanými klíšťaty i přes přítomnost protilátek a nízkou virémii hostitele (Jones et al. 1987, Labuda et al. 1993, Nuttall & Labuda 2004, Higgs et al. 2005 Nuttall 2023).

V posledních několika desetiletích zůstává klíšťová encefalitida, navzdory existence účinné vakcinace, veřejnou hrozbou v mnoha státech Evropy a Asie (Süss 2011). Přírozená ohniska viru pokrývají rozsáhlou zeměpisnou oblast, která se rozprostírá od severní a východní Asie přes Rusko až po střední a severní Evropu. Vir je také rozšířen na jižní Balkán, do Turecka, Řecka, Itálie a severní Afriky (Chiffi et al. 2023). Klíšťová encefalitida byla detekována ve 27 evropských zemích, přičemž nejvyšší incidence onemocnění je pravidelně zachycována v České republice, pobaltských zemích a ve Slovinsku (Hansson et al. 2020). Hlubší porozumění virovému cyklu, přenosu skrz sliny klíštěte i roli klíštěcích slin v procesu transmise a diseminace by mohlo pomoci v boji s tímto onemocněním. Prvotním obranným

mechanismem po kousnutí klíštěte je kožní imunita, která tak hraje velmi důležitou roli v determinaci diseminace klíšťové encefalitidy.

Kůže je největším orgánem lidského těla s komplexní sítí mnoha buněčných typů zajišťujících dynamickou mezibuněčnou komunikaci a zprostředkovávajících životně důležité procesy, jakými jsou imunitní reakce včetně vyvolání zánětu a imunologické tolerance, prevence onemocnění, hojení ran, regenerace tkání a angiogeneze (Matejuk 2018). Prvořadý význam má bariérová funkce pokožky, převážně pak epidermis, chránící před expozicí stresorům přicházejícím z vnějšího a vnitřního prostředí (Kanitakis 2002, Barbieri et al. 2014, Clausen & Agner 2016). V případě poškození kůže klíštětem nebo jinými krev sajícími členovci, se jako první s antigeny ústního ústrojí, slin či přenášených patogenů setkávají epidermální a dermální buňky (Kotál et al. 2015). Mechanické poškození i rozpoznání antigenů díky množství PRRs nacházejících se na kožních buňkách vyvolávají hemostázu a prozánětlivou imunitní odpověď. Krev sající členovci a zejména pak ixodní klíšťata obsahují ve svých slinách řadu látek, které přirozené obranné mechanismy hostitele potlačují. Toto utlumení je výhodné pro řadu patogenů, kteří využívají slin klíšťat a komárů jako vehikulum pro svou transmisí a upravené imunologické prostředí hostiteli kůže jim umožňuje snadnější přenos a primární replikaci. Jedním z nich je právě virus klíšťové encefalitidy přenášený ixodními klíšťaty. Při přenosu do hostitele se jako první setkává s buňkami kůže, zejména pak s keratinocyty, jejichž počet je v epidermis zdaleka nejvyšší (Kotál et al. 2015, Lawton 2019).

Keratinocyty jsou predominantní a velmi dynamický buněčný typ, jehož úloha dalece přesahuje pouze strukturní složku epidermis. Keratinocyty jsou vybaveny širokou škálou PRRs a dokáží tak rozpoznat téměř jakýkoliv typ mikrobů – od jednoduchých virů, přes bakterie až po složité parazity, houby a jiné antigenní struktury či molekuly. Mimo to dokáží rozpoznat molekulární vzorce poškozených či mutovaných buněk. Po stimulaci příslušných receptorů jsou keratinocyty schopné produkovat celou řadu prozánětlivých cytokinů, chemokinů a růstových faktorů a jsou tudíž schopné aktivovat a řídit polarizované adaptivní imunitní odpovědi ve směrech Th1, Th2, Th17 a také zánětlivé odpovědi proti vlastním tkáním. Primární kultura keratinocytů je užitečným prostředkem ke studiu imunologických procesů kůže i jejich ovlivnění slinami klíšťat (Jiang et al. 2020, Bailey et al 2014).

Prvotním cílem mé práce byla příprava primární kultury myších keratinocytů. Keratinocyty byly připravované dle protokolu Bailey et al. 2014 trypsinizací kůží čerstvě narozených mláďat myšičího kmene C57BL/6N. Bailey et al dále popisují přípravu keratinocytů z myšičích ocasů, jenomže buňky získané tímto způsobem rostou pomaleji a je zapotřebí obětovat větší množství myší než v případě použití myšičích mláďat. Primární kultura byla

několikrát úspěšně připravena, nicméně životnost získaných buněk se pohybovala pouze okolo dvou týdnů. Keratinocyty byly jednou zamrazeny, a to v Air a Growth médiu, ale po oživení nevykazovaly téměř žádný nebo pouze omezený růst a nebylo je tak možné použít k dalším pokusům. Zároveň jsme nedokázaly keratinocyty ani úspěšně pasážovat, jelikož buňky uvolněné versen-trypsinem a přesunuté do nových panelů či kultivačních lahví nevykazovaly žádný růst a brzy umíraly. Keratinocyty tak byly po tomto zjištění nasazovány rovnou do panelů použitých pro další experimenty a bylo jim pouze měněno médium každý druhý až třetí den. Tímto způsobem bylo možné kulturu uchovat po dobu přibližně 10-14 dnů v poměrně dobrém stavu. Krátká životnost a omezená možnost pasážování námi připravené kultury byla nejspíše způsobena izolací buněk nejen z lamina basalis epidermis ale i z vyšších než bazálních vrstev. Většina izolovaných buněk tak byla již diferencovaná, a při kultivaci keratinocyty rychle podléhaly terminální diferenciaci a měly pouze omezenou schopnost dělení.

Proliferující buňky epidermis leží v lamina basalis. Nacházejí se zde dva typy keratinocytů – diferencované keratinocyty a epidermální keratinocytové kmenové buňky (bazální buňky), které mají velkou kapacitu obnovování, ve velké míře exprimují  $\beta 1$  integriny a rapidně adherují k proteinům extracelulární matrix. Kmenové buňky epidermis mohou diferencovat na nové epidermální kmenové buňky nebo na keratinocyty, které dále proliferují a diferencují ve svrchnějších vrstvách epidermis. Keratinocyty jsou programovány k terminální diferenciaci po několika cyklech dělení. Hlavním regulátorem diferenciaci keratinocytů *in vivo* a *in vitro* je kalcium. Vápník reguluje řadu signálních drah, které se podílejí na diferenciaci buněk, včetně tvorby desmosomů, adhezních spojů a tight junction, které udržují adhezi mezi keratinocyty a hrají důležitou vnitrobuněčnou signální roli prostřednictvím aktivace různých kináz a fosfolipáz, které produkují druhé posly regulující intracelulární volný vápník a aktivitu PKC, jež je pro proces diferenciaci kritická (Bikle et al. 2012). Diferencované keratinocyty exprimují nižší množství  $\beta 1$  integrinů a adherují k extracelulární matrix mnohem pomaleji než epidermální kmenové buňky (Jones & Watt 1993, Jones et al. 1995, Häkkinen et al. 2001).

Protokol k přípravě keratinocytů podle Häkkinen et al. 2001 využívá těchto faktů tím, že buňky enzymaticky získané z epidermis čerstvě narozených myši jsou nasazeny na panely, jejichž dno je pokryto matrix s kolagenem typu I a fibronektinem. Buňky jsou takto ponechány po dobu 10 minut, což je dostatek času k adhezi epidermálních kmenových buněk. Epidermální keratinocytové kmenové buňky exprimují větší množství kolagenového receptoru  $\alpha 2\beta 1$  než diferencovanější keratinocyty (Häkkinen et al. 2001). Již diferencované

keratinocyty nejsou schopné adherovat v takto krátkém čase a jsou odplaveny pomocí růstového média. Čerstvě izolované buňky (diferencované keratinocyty a epidermální kmenové buňky) ovšem nejsou schopné adherovat k fibronektinu a to buď expresí nefunkčního fibronektinového receptoru  $\alpha 5\beta 1$  nebo úplnou absencí tohoto receptoru a absencí integrinu  $\alpha v\beta 6$  (Takashima & Grinnell 1985). Expresie receptoru  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha v\beta 6$  integrinů je vyvolaná procesem hojení poškozené kůže a také v buněčných kulturách po 2-5 dnech kultivace (Takashima & Grinnell 1985, Breuss et al. 1995, Haapasalmi et al. 1996, Brzozowska & Deshmukh 2022).  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha v\beta 6$  integriny mohou dále podporovat proliferaci buněk a přítomnost fibronektinu v matrix jamek panelů k tomuto procesu přispívá (Agrez et al. 1994, Pivarcsi et al. 2001).

Výhodou takto připravených keratinocytů je jejich delší životnost a možnost pasážování. Buňky je také možné zamrazit a po oživení je uchovávat až po dobu 10 pasáží. Pro další pokusy s primární kulturou keratinocytů by proto bylo vhodné protokol pro jejich přípravu pozměnit tak, aby došlo k brzkému odlišení epidermálních keratinocytových kmenových buněk a již diferencovaných keratinocytů. Bylo by tak možné buňky využít k více pokusům a snížilo by se množství použitých myších mláďat.

Virus klíšťové encefalidity je v naprosté většině případů přenášen na lidského hostitele kousnutím infikovaného klíšťete. Dospělci, nymfy i larvy pronikají svým hypostomem do vrstev kůže, kde se nacházejí krevní cévy. Dle druhu klíšťete a místa sání pronikají do různých hloubek dermis. Sliny se dostávají do celého místa poškození a společně s přenášenými patogeny se setkávají se všemi typy buněk kůže. V první fázi infekce virem klíšťové encefalidity se TBEV replikuje v dermálních dendritických buňkách, Langerhansových buňkách, kožních neutrofilech a dalších buňkách, jako jsou monocyty a makrofágy, které umožňují přenos do lymfatických uzlin a šíření viru do dalších částí těla (Kollaritsch et al. 2012, Ruzek et al. 2019). Jelikož se TBEV potřebuje dostat do lymfatických uzlin v migrujících infikovaných buňkách, zdá se být role keratinocytů v nastolení úspěšné infekce minoritní. Nicméně vzhledem k hojnosti keratinocytů v místě poškození klíšťecím hypostomem by měla být brána v potaz úvaha, zda právě infekce keratinocytů neumožňuje viru zvýšení titru v kůži natolik, aby došlo k úspěšné infekci migrujících imunitních buněk, které se v kůži zdaleka nenacházejí v tak vysokém množství jako keratinocyty. O infekci keratinocytů virem klíšťové encefalidity se píše pouze v jedné publikaci, kde Labuda a tým prokázali infekci keratinocytů virem TBE *in vitro* (Labuda et al. 1996). V mé práci se podařilo myši keratinocyty infikovat virem klíšťové encefalidity kmene Hypr úspěšně několikrát a



nejvyšších titrů dosahoval virus vždy třetí den po infekci. Objasnění mechanismu infekce keratinocytů virem klíšťové encefalitidy by mohlo přispět k hlubšímu poznání patogenezise viru klíšťové encefalitidy, včetně specifických receptorů, kterými se virus do buněk dostává a také identifikaci SAT faktorů klíštěcích slin, které viru přenos usnadňují. Klíštěcí sliny totiž nepochybně hrají v transmisi klíšťové encefalitidy velkou roli.

Hematofágní členovci ve svých slinách přenášejí patogeny, které jsou inokulovány do místa poškození kůže hostitele. Poprvé bylo klíště ustanoveno vektorem patogenů v roce 1893, kdy Smith & Kilbourne demonstrovali přenos intraerytrocytárního patogenu *Babesia bigemina* mezi dobytkem (Smith et al. 1893, Assadian & Stanek 2002). Od této události jsme ušli dlouhou cestu a dnes je již dobře známo, že sliny klíšťat, komárů a dalších krevsajících členovců přispívají ke zvýšení infekce hostitele (Jones et al. 1989, Labuda et al. 1993, Krocová et al. 2003, Schneider & Higgs 2008, Horká et al. 2009, Styer et al. 2011).

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, jak klíštěcí sliny a extrakty ze slinných žláz z klíšťat sajících různý počet dní ovlivňují infekci keratinocytů virem klíšťové encefalitidy. V pokusech byly buňky infikovány virem v různých multiplicitách s přidavkem slin nebo SGE a virem samotným. Zdaleka největší rozdíly byly pozorovány ve vzorcích s extraktem ze slinných žláz z klíšťat sajících jeden den. Tento výsledek není až tak překvapivý, když vezmeme v potaz fakt, že TBEV se sice množí ve střevech klíštěte po aspiraci infikované krve, ale po pomnožení migruje do slinných žláz odkud je přenášen prakticky ihned po počátku salivace a nejvíce infekční je tedy klíště v prvních minutách až hodinách po začátku sání (Ebel & Kramer 2004, Hermance & Thangamani 2015). Dospělé klíště může sát až po dobu deseti dní, nicméně sliny mají pravděpodobně nejsilnější efekt na usnadnění replikace a diseminace viru právě v prvních dnech sání, jelikož později je TBEV slinami přenášen jen v nevýznamném množství. Tomu odpovídaly i výsledky našich pokusů, kdy bylo pozorováno zvýšení titru viru téměř ve všech časových intervalech a všech multiplicitách v sérii pokusů s SGE z klíšťat sajících jeden den. Výjimkou byl pouze vzorek při multiplicitě 0,1 v prvním dni po infekci buněk, kde vyšších titrů dosahovala kontrolní skupina bez SGE. Extrakty ze slinných žláz klíšťat sajících po delší dobu (3 a 6 dní) zvyšovaly množství viru prakticky pouze u nejnižší použité multiplicity (MOI=0,1). Takto nízká infekční dávka viru v kontrolních skupinách ovšem obsahovala měřitelný titer pouze v prvním dni po infekci. V následujících dnech nebyl již virus v keratinocytech detekován. To by mohlo znamenat, že virus možná není schopný v takto nízkých multiplicitách bez pomoci molekul klíštěcích slin cílovou tkáň infikovat. Na vyšší infekční dávky viru (MOI=1 a MOI=10) měl extrakt ze slinných žláz pozitivní efekt pouze při použití extraktu z klíšťat sajících jeden den (ve všech časových

intervalech) a poté v prvním dni po infekci u extraktu z klíšťat sajících po dobu tří dnů. V dalších dnech po infekci bylo pozorováno spíše snížení titru viru oproti kontrolní skupině. Salivace není kontinuální proces a molekulové složení klíštěcích slin se v průběhu sání mění (McSwain et al. 1982, Kaufman 1989, Ribeiro et al. 2006). Proto jsem chtěla porovnat klíštěcí sliny a extrakt ze slinných žláz z klíšťat sajících stejný počet dní. SGE z téměř plně nasátých klíšťat (6 dnů) by měl mít na infekci teoreticky stejný efekt jako klíštěcí sliny, které jsou získávány z klíšťat sajících po dobu šesti dní. V našich pokusech se tato hypotéza ovšem nepotvrdila. Sliny zvyšovaly replikaci ve dvou multiplicitách ( $MOI=0,1$  a  $MOI=1$ ) v téměř všech časových intervalech, zatímco SGE ze šestého dne pouze v časech 2dpi a 3dpi u multiplicity 0,1. V těchto časových intervalech ovšem nebyl v kontrolních vzorcích detekován žádný virus, tudíž výsledek nemusí nutně znamenat zvýšení, ale udržení výchozího množství viru, který bez molekul slin/SGE nedokázal buňky infikovat. Rozdíl mezi slinami a SGE může být způsoben i tím, že v obou případech byla použita koncentrace proteinu 20ug/ml. Ve slinách ovšem tato koncentrace víceméně odpovídá množství bioaktivních molekul, zatímco v extraktu ze slinných žláz musíme připočítat také proteiny tvořící strukturu slinných žláz, zejména pak kolagen, jehož množství je nezanedbatelné. Z tohoto důvodu si myslím, že v příštích pokusech by měla být koncentrace proteinu v extraktech ze slinných žláz zvýšena anebo při porovnávání se slinami koncentrace proteinu ve slinách adekvátně snížena. Vzhledem k výsledkům poukazujícím na nejvyšší účinnost extraktu z klíšťat sajících jeden den by bylo dobré v dalších pokusech používat právě tento interval sání i přes výzvy spojené s vyjmutím malých slinných žláz. Dále by bylo dobré vzít v potaz skutečnost, že u mnoha patogenů přenášených klíšťaty epidemiologické údaje naznačují, že klíšťata přenášejí tyto patogeny především v nižších vývojových stádiích (larva, nymfa). Proto by bylo dobré provést další studii nedospělých stádií, aby se zjistilo, jaká je jejich farmakologická zdatnost v porovnání s dospělými klíšťaty (Nuttall & Labuda 2004). Při studiu virů přenášených klíšťaty je také důležité vzít v úvahu dobu potřebnou k přenosu viru na hostitele a množství viru, které je jedno klíště schopno přenést během určité doby krmení. Slinami asistovaný přenos je přítomný v koncentracích viru přirozených pro přenos klíštěcím vektorem, nikoliv ve vyšších (Hermance & Thangamani 2015). Extrakt ze slinných žláz jednoznačně poskytuje virům přenášeným klíšťaty výhodnější prostředí pro jejich transmissi a diseminaci. Podporuje infekci hostitele, ale také zjednodušuje přenos viru mezi klíšťaty sajícími blízko u sebe (Jones et al. 1989, Labuda et al. 1993, Hermance & Thangamani 2015). Otázkou ale je, jaké procesy stojí za usnadněním virové infekce v savčích hostitelích. Prvotní obranou proti virovým nákazám je produkce interferonů buňkami. Interferony mají parakrinní efekt a po navázání na

membránu sousedních buněk v nich navozují antivirový stav, který v buňce zastavuje translaci. Produkci interferonů varuje infikovaná buňka sousední buňky a transmise viru je tak zpomalena až znemožněna.

Interferony jsou široká rodina cytokinů rozdělená do tří typů. Všechny interferony mají společnou schopnost vyvolávat protivirový stav iniciovaný interakcí s příslušnými receptory (Negishi et al. 2018). Jako první byly objeveny interferony typu I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), které jsou produkovány většinou buněk, včetně buněk kůže a keratinocytů. Do druhého typu interferonů patří jediný zástupce, IFN- $\gamma$ , který je strukturně odlišný od ostatních interferonů a je kritickým cytokinem produkováným aktivovanými NK buňkami a cytotoxickými T lymfocyty (Gray & Goeddel 1982). Keratinocyty a jiné kožní buňky tento interferon neprodukují. Třetím typem interferonů jsou IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 a IFN- $\lambda$ 3 strukturou i aktivací podobné IFN typu I a IL-10 (Negishi et al. 2018). Odpovědi vyvolané IFN typu I a IFN typu III jsou velice podobné, *in vivo* však nejsou zcela redundantní, protože jejich příspěvek k protivirové obraně velmi závisí na druhu viru. IFN- $\lambda$  je exprimován převážně v epitelální tkáni (Hermant & Michiels 2014). Keratinocyty v odpovědi na virovou infekci produkují zejména IFN- $\lambda$  a IFN- $\beta$ , a to brzy po rozpoznání přítomnosti virů příslušnými buněčnými receptory (TLRs, RLRs, CLR, NLRs) nebo po jejich stimulaci jinými podněty, jako jsou UVB či lipopolysacharid (Fujisawa et al. 1997, Zahn et al. 2011). V mých pokusech se podařilo potvrdit přítomnost jak IFN- $\beta$ , tak i IFN- $\lambda$  a nejvyšších koncentrací dosahovaly oba cytokiny při nejnižší multiplicitě viru (MOI=0,1) v časech 1dpi a 2dpi. Přítomnost interferonů byla zjišťována pouze v kontrolních vzorcích a následně byl proveden pokus, který měl za úkol stanovit protivirovou aktivitu interferonů a vliv klíštěcích slin (MOI=10, 2dpi). Jakákoliv protektivní funkce interferonů ovšem nebyla potvrzena a nepozorovali jsme ani žádný efekt klíštěcích slin. Při infekci kůže viry přenášenými klíšťaty nejsou keratinocyty jedinými buňkami produkujícími interferony a další prozánětlivé cytokiny. Je tedy možné, že pro protektivní funkci interferonů  $\beta$  a  $\lambda$  je zapotřebí kooperativní aktivita kožních buněk v produkci cytokinů. Další pokusy by měly vzít tuto úvahu v potaz a zároveň by měl být pokus znovu zopakován s různými infekčními dávkami viru.

## 6. Závěr

- Primární kultura myších keratinocytů byla úspěšně připravena
- Podařilo se extrahovat slinné žlázy z klíšťat
- Byla potvrzena replikace TBEV v keratinocytech
- Slin a SGE zvyšuje replikaci TBEV v keratinocytech v určitých časech a multiplicitách
- Potvrdila se produkce IFN- $\lambda$  a IFN- $\beta$  infikovanými keratinocyty

## 7. Abecední seznam zkratk

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AMPs	antimicrobial peptides
APC	antigen presenting cells
AVPs	antiviral peptides
CD	cluster of differentiation
CLR	C-peptide like receptor
CNS	central nervous system
DAMPs	damage associated molecular patterns
DCs	dendritic cells
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleotic acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatic reticulum
FGF	fibroblast growth factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HSR	histamine releasing factor
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IRF	interferon regulatory factor
LCs	Langerhans cells
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MSH	$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormon
NKc	natural killer cells
NLR	NOD (nucleotide binding domain)-like receptor
NO	nitric oxide
ORF	open reading frame
PAMPs	pathogen associated molecular pattern

PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PES	post-encephalitic syndrome
PFU	plaque forming unit
PRRs	pattern recognition receptors
RLR	RIG (retinoic acid-inducible gene I)-like receptor
RNA	ribonucleotic acid
SGE	salivary gland extract
TBEV	tick borne encephalitis virus
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
UPR	unfolded protein response
UTR	untranslated region
UVB	ultra violet B
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 8. Seznam použité literatury

Agrez M, Chen A, Cone RI, Pytela R, Sheppard D. The alpha v beta 6 integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the beta 6 cytoplasmic domain. *The Journal of cell biology*. 1994;127(2):547-556. doi:[10.1083/jcb.127.2.547](https://doi.org/10.1083/jcb.127.2.547)

Allison SL, Tao YJ, O'Riordain G, Mandl CW, Harrison SC, Heinz FX. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol*. 2003;77(21):11357-11366. doi:[10.1128/jvi.77.21.11357-11366.2003](https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11357-11366.2003)

Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2008;22(2):195-215. doi:[10.1016/j.idc.2007.12.006](https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006)

Assadian O, Stanek G. Theobald Smith--the discoverer of ticks as vectors of disease. *Wien Klin Wochenschr*. 2002;114(13-14):479-481.

Avsic-Zupanc T, Poljak M, Maticic M, et al. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin Diagn Virol*. 1995;4(1):51-59. doi:[10.1016/0928-0197\(94\)00062-y](https://doi.org/10.1016/0928-0197(94)00062-y)

Bailey LJ, Choudhary V, Merai P, Bollag WB. Preparation of Primary Cultures of Mouse Epidermal Keratinocytes and the Measurement of Phospholipase D Activity. In: Turksen K, ed. *Epidermal Cells*. Vol 1195. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2014:111-131. doi:[10.1007/7651\\_2014\\_80](https://doi.org/10.1007/7651_2014_80)

Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):26-32. doi:[10.1016/j.nbd.2009.07.031](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.031)

Barbieri JS, Wanat K, Seykora J. Skin: Basic Structure and Function. In: *Pathobiology of Human Disease*. Elsevier; 2014:1134-1144. doi:[10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2)

Barthe M, Thénot JP, Osman-Ponchet H. *Effect of Ultraviolet Radiation on the Expression of Drug Transporters in In Vitro Skin Models*. MEDICINE & PHARMACOLOGY; 2020. doi:[10.20944/preprints202012.0067.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202012.0067.v1)



- Biga LM, Bronson S, Dawson S, et al. 5.1 Layers of the Skin. Published online September 26, 2019. Accessed March 6, 2024. <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>
- Bikle DD, Xie Z, Tu CL. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2012;7(4):461-472. doi:[10.1586/eem.12.34](https://doi.org/10.1586/eem.12.34)
- Black APB, Ardern-Jones MR, Kasprowicz V, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(6):1485-1493. doi:[10.1002/eji.200636915](https://doi.org/10.1002/eji.200636915)
- Blom K, Cuapio A, Sandberg JT, et al. Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2174. doi:[10.3389/fimmu.2018.02174](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02174)
- Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *WJCC.* 2015;3(5):430. doi:[10.12998/wjcc.v3.i5.430](https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430)
- Boulanger N, Boyer P, Talagrand-Reboul E, Hansmann Y. Ticks and tick-borne diseases. *Med Mal Infect.* 2019;49(2):87-97. doi:[10.1016/j.medmal.2019.01.007](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007)
- Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, et al. Expression of the  $\beta 6$  integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *Journal of Cell Science.* 1995;108(6):2241-2251. doi:[10.1242/jcs.108.6.2241](https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2241)
- Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. *Parasitology.* 2004;129 Suppl:S161-176. doi:[10.1017/s0031182004004834](https://doi.org/10.1017/s0031182004004834)
- Brzozowska E, Deshmukh S. Integrin Alpha v Beta 6 ( $\alpha v\beta 6$ ) and Its Implications in Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12346. doi:[10.3390/ijms232012346](https://doi.org/10.3390/ijms232012346)
- Caini S, Szomor K, Ferenczi E, et al. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill.* 2012;17(12):20128.
- Carletti G, Nervo G, Cattivelli L. Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. *Int J Biol Sci.* 2014;10(10):1159-1170. doi:[10.7150/ijbs.9672](https://doi.org/10.7150/ijbs.9672)

- Carrier Y, Ma HL, Ramon HE, et al. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2011;131(12):2428-2437. doi:[10.1038/jid.2011.234](https://doi.org/10.1038/jid.2011.234)
- Carvalho-Costa TM, Mendes MT, da Silva MV, et al. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasit Vectors*. 2015;8:22. doi:[10.1186/s13071-015-0634-7](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0634-7)
- Cavassani KA, Aliberti JC, Dias ARV, Silva JS, Ferreira BR. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2005;114(2):235-245. doi:[10.1111/j.1365-2567.2004.02079.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02079.x)
- Clausen ML, Agner T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:38-46. doi:[10.1159/000441543](https://doi.org/10.1159/000441543)
- Coates M, Blanchard S, MacLeod AS. Innate antimicrobial immunity in the skin: A protective barrier against bacteria, viruses, and fungi. *PLoS Pathog*. 2018;14(12):e1007353. doi:[10.1371/journal.ppat.1007353](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007353)
- Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001205. doi:[10.1371/journal.ppat.1001205](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001205)
- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerging Microbes & Infections*. 2018;7(1):1-9. doi:[10.1038/s41426-018-0081-6](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6)
- Donchenko I, Kutsar K, Vasilenko V, Kerbo N. Tickborne encephalitis outbreak in Estonia linked to raw goat milk, May-June 2005. *Weekly releases (1997–2007)*. 2005;10(25):2730. doi:[10.2807/esw.10.25.02730-en](https://doi.org/10.2807/esw.10.25.02730-en)
- Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis*. 2010;8(4):213-222. doi:[10.1016/j.tmaid.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.010)

Duangkhae P, Erdos G, Ryman KD, et al. Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2018;138(3):618-626. doi:[10.1016/j.jid.2017.10.018](https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.018)

Ebel GD, Kramer LD. Short report: duration of tick attachment required for transmission of powassan virus by deer ticks. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(3):268-271.

Eremeeva ME, Dasch GA. Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. *Front Public Health*. 2015;3:55. doi:[10.3389/fpubh.2015.00055](https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00055)

Feliciani C, Gupta AK, Saucier DN. Keratinocytes and Cytokine/Growth Factors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1996;7(4):300-318. doi:[10.1177/10454411960070040101](https://doi.org/10.1177/10454411960070040101)

Fialová A, Cimburek Z, Iezzi G, Kopecký J. Ixodes ricinus tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes Infect*. 2010;12(7):580-585. doi:[10.1016/j.micinf.2010.03.015](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.015)

Fong M, Crane JS. Histology, Mast Cells. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed March 19, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499904/>

Formanová P, Černý J, Bolfíková BČ, et al. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015;6(1):38-46. doi:[10.1016/j.ttbdis.2014.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.09.002)

Francischetti IMB. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*. 2010;56(7):1130-1144. doi:[10.1016/j.toxicon.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.003)

Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(6):2051-2088. doi:[10.2741/3363](https://doi.org/10.2741/3363)

Fujisawa H, Kondo S, Wang B, Shivji GM, Sauder DN. The Expression and Modulation of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in Human Keratinocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1997;17(12):721-725. doi:[10.1089/jir.1997.17.721](https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.721)

Füzik T, Formanová P, Růžek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun*. 2018;9(1):436. doi:[10.1038/s41467-018-02882-0](https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0)

Garcia M, Alout H, Diop F, et al. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:387. doi:[10.3389/fcimb.2018.00387](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00387)

Gelpi E, Preusser M, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX, Budka H. Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(6):506-512. doi:[10.1093/jnen/64.6.506](https://doi.org/10.1093/jnen/64.6.506)

Goleva E, Berdyshev E, Leung DY. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1463-1474. doi:[10.1172/JCI124608](https://doi.org/10.1172/JCI124608)

Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature.* 1982;298(5877):859-863. doi:[10.1038/298859a0](https://doi.org/10.1038/298859a0)

Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Res.* 1995;35(3):307-321. doi:[10.1016/0168-1702\(94\)00090-y](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)00090-y)

Gundra U, Girgis N, Ruckeri D, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood.* 2014;123(20). doi:[10.1182/blood-2013-08-520619](https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520619)

Haapasalmi K, Zhang K, Tonnesen M, et al. Keratinocytes in Human Wounds Express  $\alpha\beta 6$  Integrin. *Journal of Investigative Dermatology.* 1996;106(1):42-48. doi:[10.1111/1523-1747.ep12327199](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12327199)

Häkkinen L, Koivisto L, Larjava H. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *Methods Cell Sci.* 2001;23(4):189-196. doi:[10.1023/A:1016385109922](https://doi.org/10.1023/A:1016385109922)

Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17):8880-8896. doi:[10.1128/JVI.00354-15](https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15)

Hansson KE, Rosdahl A, Insulander M, et al. Tick-borne Encephalitis Vaccine Failures: A 10-year Retrospective Study Supporting the Rationale for Adding an Extra Priming Dose in Individuals Starting at Age 50 Years. *Clin Infect Dis.* 2020;70(2):245-251. doi:[10.1093/cid/ciz176](https://doi.org/10.1093/cid/ciz176)

Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):978-985. doi:[10.1038/ni.2680](https://doi.org/10.1038/ni.2680)

Hermance ME, Thangamani S. Tick Saliva Enhances Powassan Virus Transmission to the Host, Influencing Its Dissemination and the Course of Disease. *Journal of Virology*. 2015;89(15):7852-7860. doi:[10.1128/jvi.01056-15](https://doi.org/10.1128/jvi.01056-15)

Hermant P, Michiels T. Interferon- $\lambda$  in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun*. 2014;6(5):563-574. doi:[10.1159/000360084](https://doi.org/10.1159/000360084)

Higgs S, Schneider BS, Vanlandingham DL, Klingler KA, Gould EA. Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(25):8871-8874. doi:[10.1073/pnas.0503835102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503835102)

Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, et al. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(10):1671-1673. doi:[10.3201/eid1510.090743](https://doi.org/10.3201/eid1510.090743)

Horká H, Cerná-Kýčková K, Skallová A, Kopecký J. Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int J Med Microbiol*. 2009;299(5):373-380. doi:[10.1016/j.ijmm.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.10.009)

Hume DA. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Frontiers in Immunology*. 2015;6. Accessed March 18, 2024. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2015.00370>

Chessa C, Bodet C, Jousselin C, Wehbe M, Lévêque N, Garcia M. Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:[10.3389/fmicb.2020.01155](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01155)

Chiffi G, Grandgirard D, Leib SL, Chrdle A, Růžek D. Tick-borne encephalitis: A comprehensive review of the epidemiology, virology, and clinical picture. *Reviews in Medical Virology*. 2023;33(5):e2470. doi:[10.1002/rmv.2470](https://doi.org/10.1002/rmv.2470)

Chmelar J, Calvo E, Pedra JHF, Francischetti IMB, Kotsyfakis M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J Proteomics*. 2012;75(13):3842-3854. doi:[10.1016/j.jprot.2012.04.026](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026)

Chrdle A, Chmelík V, Růžek D. Tick-borne encephalitis: What travelers should know when visiting an endemic country. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2694-2699. doi:[10.1080/21645515.2016.1218098](https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1218098)

Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, et al. Cytokinocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. 2020;5(20):e142067. doi:[10.1172/jci.insight.142067](https://doi.org/10.1172/jci.insight.142067)

Jones LD, Davies CR, Steele GM, Nuttall PA. A Novel Mode of Arbovirus Transmission Involving a Nonviremic Host. *Science*. 1987;237(4816):775-777. doi:[10.1126/science.3616608](https://doi.org/10.1126/science.3616608)

Jones LD, Hodgson E, Nuttall\* PA. Enhancement of Virus Transmission by Tick Salivary Glands. *Journal of General Virology*. 1989;70(7):1895-1898. doi:[10.1099/0022-1317-70-7-1895](https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-7-1895)

Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*. 1995;80(1):83-93. doi:[10.1016/0092-8674\(95\)90453-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90453-0)

Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 1993;73(4):713-724. doi:[10.1016/0092-8674\(93\)90251-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90251-K)

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S3-14. doi:[10.1017/s0031182004005967](https://doi.org/10.1017/s0031182004005967)

Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:163-194. doi:[10.1146/annurev-immunol-032712-100001](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100001)

Kanda N, Shimizu T, Tada Y, Watanabe S. IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Eur J Immunol*. 2007;37(2):338-350. doi:[10.1002/eji.200636420](https://doi.org/10.1002/eji.200636420)

Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390-399; quiz 400-401.



- Kaufman WR. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitology Today*. 1989;5(2):47-56. doi:[10.1016/0169-4758\(89\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90191-9)
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317-337. doi:[10.1093/intimm/dxp017](https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017)
- Kazimírová M, Štibrániová I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:43. doi:[10.3389/fcimb.2013.00043](https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043)
- Kerlik J, Avdičová M, Musilová M, Běrešová J, Mezencev R. Breast Milk as Route of Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission from Mother to Infant. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(5):1060-1061. doi:[10.3201/eid2805.212457](https://doi.org/10.3201/eid2805.212457)
- Kindberg E, Mickiene A, Ax C, et al. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J Infect Dis*. 2008;197(2):266-269. doi:[10.1086/524709](https://doi.org/10.1086/524709)
- Klompen JSH, Black WC, Keirans JE, Oliver JH. Evolution of Ticks. *Annu Rev Entomol*. 1996;41(1):141-161. doi:[10.1146/annurev.en.41.010196.001041](https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001041)
- Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011;3(4):203. doi:[10.1097/JDN.0b013e3182274a98](https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98)
- Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Holzmann H, Hombach J, Bjorvatn B, Barrett A. Vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(9):1103-1119. doi:[10.1586/erv.12.86](https://doi.org/10.1586/erv.12.86)
- Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, et al. Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*. 2015;128:58-68. doi:[10.1016/j.jprot.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.005)
- Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, et al. CHARACTERISTICS OF THE BAIKAL SUBTYPE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS CIRCULATING IN EASTERN SIBERIA. *Acta biomedica scientifica*. 2018;3(4):53-60. doi:[10.29413/ABS.2018-3.4.9](https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.4.9)
- Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Shevtsova AS, et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2010;398(2):262-272. doi:[10.1016/j.virol.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.012)



- Krocová Z, Macela A, Hernychová L, Kroca M, Pechová J, Kopecký J. Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J Parasitol.* 2003;89(1):14-20. doi:[10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0014:TSGEAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0014:TSGEAP]2.0.CO;2)
- Kunitski M, Eicke N, Huber P, et al. Double-slit photoelectron interference in strong-field ionization of the neon dimer. *Nat Commun.* 2019;10(1):1. doi:[10.1038/s41467-018-07882-8](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07882-8)
- Kuthejlová M, Kopecký J, Štěpánová G, Macela A. Tick Salivary Gland Extract Inhibits Killing of *Borrelia afzelii* Spirochetes by Mouse Macrophages. *Infect Immun.* 2001;69(1):575-578. doi:[10.1128/IAI.69.1.575-578.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.575-578.2001)
- Kwasnik M, Rola J, Rozek W. Tick-Borne Encephalitis—Review of the Current Status. *Journal of Clinical Medicine.* 2023;12(20):6603. doi:[10.3390/jcm12206603](https://doi.org/10.3390/jcm12206603)
- Kwock JT, Handfield C, Suwanpradid J, et al. IL-27 signaling activates skin cells to induce innate antiviral proteins and protects against Zika virus infection. *Sci Adv.* 2020;6(14):eaay3245. doi:[10.1126/sciadv.aay3245](https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3245)
- Kýčková K, Kopecký J. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J Med Entomol.* 2006;43(6):1208-1214.
- Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, et al. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology.* 1996;219(2):357-366. doi:[10.1006/viro.1996.0261](https://doi.org/10.1006/viro.1996.0261)
- Labuda M, Jones LD, Williams T, Nuttall PA. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical Vet Entomology.* 1993;7(2):193-196. doi:[10.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x)
- Labuda M, Nuttall PA, Kožuch O, et al. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia.* 1993;49(9):802-805. doi:[10.1007/BF01923553](https://doi.org/10.1007/BF01923553)
- Lawrie CH, Randolph SE, Nuttall PA. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp Parasitol.* 1999;93(4):207-214. doi:[10.1006/expr.1999.4456](https://doi.org/10.1006/expr.1999.4456)
- Lawton S. Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nursing Times.* Published online November 25, 2019. Accessed March 5, 2024. <https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/dermatology/skin-1-the-structure-and-functions-of-the-skin-25-11-2019/>

- Lee KY. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng.* 2019;2(1):1-5. doi:[10.30579/mbse.2019.2.1.1](https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1)
- Leiby DA, Gill JE. Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. *Transfus Med Rev.* 2004;18(4):293-306. doi:[10.1016/j.tmr.2004.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tmr.2004.07.001)
- Li F, Adase CA, Zhang L juan. Isolation and Culture of Primary Mouse Keratinocytes from Neonatal and Adult Mouse Skin. *JoVE.* 2017;(125):56027. doi:[10.3791/56027](https://doi.org/10.3791/56027)
- Lim JK, Lisco A, McDermott DH, et al. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000321. doi:[10.1371/journal.ppat.1000321](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000321)
- Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, et al. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J Infect Dis.* 2017;215(6):896-901. doi:[10.1093/infdis/jix040](https://doi.org/10.1093/infdis/jix040)
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 8):1781-1794. doi:[10.1099/vir.0.011437-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.011437-0)
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology.* 2004;25(12):677-686. doi:[10.1016/j.it.2004.09.015](https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015)
- Matejuk A. Skin Immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2018;66(1):45-54. doi:[10.1007/s00005-017-0477-3](https://doi.org/10.1007/s00005-017-0477-3)
- McSwain JL, Essenberg RC, Sauer JR. Protein changes in the salivary glands of the female lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *J Parasitol.* 1982;68(1):100-106.
- Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(3):145-149. doi:[10.1158/2326-6066.CIR-13-0102](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0102)
- Miorin L, Romero-Brey I, Maiuri P, et al. Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J Virol.* 2013;87(11):6469-6481. doi:[10.1128/JVI.03456-12](https://doi.org/10.1128/JVI.03456-12)

- Mizumoto N, Takashima A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest*. 2004;113(5):658-660. doi:[10.1172/JCI200421140](https://doi.org/10.1172/JCI200421140)
- Moody DB, Porcelli SA. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):11-22. doi:[10.1038/nri979](https://doi.org/10.1038/nri979)
- Morita E, Suzuki Y. Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex-Its Organization and Regulation. *Viruses*. 2021;13(6):1060. doi:[10.3390/v13061060](https://doi.org/10.3390/v13061060)
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(2):209-212. doi:[10.1189/jlb.0602325](https://doi.org/10.1189/jlb.0602325)
- Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(11):a028423. doi:[10.1101/cshperspect.a028423](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423)
- Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *IJMS*. 2019;20(8):1811. doi:[10.3390/ijms20081811](https://doi.org/10.3390/ijms20081811)
- Nuttall PA, Labuda M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*. 2004;129(S1):S177-S189. doi:[10.1017/S0031182004005633](https://doi.org/10.1017/S0031182004005633)
- Nuttall PA. Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wien Klin Wochenschr*. 2023;135(7):165-176. doi:[10.1007/s00508-019-1500-y](https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y)
- Oliver JH. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annu Rev Ecol Syst*. 1989;20(1):397-430. doi:[10.1146/annurev.es.20.110189.002145](https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.002145)
- Patton TG, Dietrich G, Brandt K, Dolan MC, Piesman J, Gilmore Jr. RD. Saliva, Salivary Gland, and Hemolymph Collection from Ixodes Scapularis Ticks. *JoVE*. 2012;(60):3894. doi:[10.3791/3894](https://doi.org/10.3791/3894)
- Pawelek JM, Chakraborty AK, Osber MP, et al. Molecular Cascades in UV Induced Melanogenesis: A Central Role for Melanotropins? *Pigment Cell Research*. 1992;5(5):348-356. doi:[10.1111/j.1600-0749.1992.tb00561.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1992.tb00561.x)

Perdiguero GE, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015;518(7540):547-551. doi:[10.1038/nature13989](https://doi.org/10.1038/nature13989)

Pivarsci A, Széll M, Kemény L, Dobozy A, Bata-Csörgő Z. Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes  $\alpha 5$  integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*. 2001;293(4):206-213. doi:[10.1007/s004030100217](https://doi.org/10.1007/s004030100217)

Preston SG, Majtán J, Kouremenou C, et al. Novel Immunomodulators from Hard Ticks Selectively Reprogramme Human Dendritic Cell Responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003450. doi:[10.1371/journal.ppat.1003450](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003450)

Prevot PP, Beschin A, Lins L, et al. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS Journal*. 2009;276(12):3235-3246. doi:[10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x)

Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol*. 2018;45(9):1044-1052. doi:[10.1111/1346-8138.14489](https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489)

Pukhovskaya NM, Morozova OV, Vysochina NP, et al. Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9(4):824-833. doi:[10.1016/j.ttbdis.2018.01.020](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.020)

Pulkkinen LIA, Butcher SJ, Anastasina M. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses*. 2018;10(7):350. doi:[10.3390/v10070350](https://doi.org/10.3390/v10070350)

Pustijanac E, Buršić M, Talapko J, Škrlec I, Meštrović T, Lišnjić D. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Prevention. *Microorganisms*. 2023;11(7):1634. doi:[10.3390/microorganisms11071634](https://doi.org/10.3390/microorganisms11071634)

Rajesh A, Wise L, Hibma M. The role of Langerhans cells in pathologies of the skin. *Immunology & Cell Biology*. 2019;97(8):700-713. doi:[10.1111/imcb.12253](https://doi.org/10.1111/imcb.12253)

Ribeiro JMC, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IMB, et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(2):111-129. doi:[10.1016/j.ibmb.2005.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.11.005)

Ribeiro JMC, Francischetti IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol*. 2003;48:73-88. doi:[10.1146/annurev.ento.48.060402.102812](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.060402.102812)

Robertson SJ, Lubick KJ, Freedman BA, Carmody AB, Best SM. Tick-borne flaviviruses antagonize both IRF-1 and type I IFN signaling to inhibit dendritic cell function. *J Immunol*. 2014;192(6):2744-2755. doi:[10.4049/jimmunol.1302110](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302110)

Rosso JD, Zeichner J, Alexis A, Cohen D, Berson D. Understanding the Epidermal Barrier in Healthy and Compromised Skin: Clinically Relevant Information for the Dermatology Practitioner. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(4 Suppl 1):S2-S8.

Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res*. 2019;164:23-51. doi:[10.1016/j.antiviral.2019.01.014](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014)

Růžek D, Dobler G, Donoso Mantke O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infect Dis*. 2010;8(4):223-232. doi:[10.1016/j.tmaid.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.06.004)

Sá-Nunes A, Báfica A, Lucas DA, et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol*. 2007;179(3):1497-1505. doi:[10.4049/jimmunol.179.3.1497](https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1497)

Sakai M, Muto M, Hirano M, Kariwa H, Yoshii K. Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3' - UTR. *Virus Res*. 2015;203:36-40. doi:[10.1016/j.virusres.2015.03.006](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.006)

Salat J, Mikulasek K, Larralde O, et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccines Contain Non-Structural Protein 1 Antigen and may Elicit NS1-Specific Antibody Responses in Vaccinated Individuals. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(1):81. doi:[10.3390/vaccines8010081](https://doi.org/10.3390/vaccines8010081)

Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):227-235. doi:[10.1007/s00441-010-1034-0](https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0)

Schittek B. The antimicrobial skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:54-67. doi:[10.1159/000323296](https://doi.org/10.1159/000323296)

Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(5):400-408. doi:[10.1016/j.trstmh.2008.01.024](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.024)

Smith T, Smith T, Kilborne FL. *Investigations into the Nature, Causation, and Prevention of Texas or Southern Cattle Fever*. U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry; 1893. doi:[10.5962/bhl.title.124068](https://doi.org/10.5962/bhl.title.124068)

Sonenshine DE, Roe RM. *Biology of Ticks Volume 2*. OUP USA; 2014.

Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol*. 2003;170(11):5583-5589. doi:[10.4049/jimmunol.170.11.5583](https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5583)

Steen NA, Barker SC, Alewood PF. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon*. 2006;47(1):1-20. doi:[10.1016/j.toxicon.2005.09.010](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.010)

Styer LM, Lim PY, Louie KL, Albright RG, Kramer LD, Bernard KA. Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *J Virol*. 2011;85(4):1517-1527. doi:[10.1128/JVI.01112-10](https://doi.org/10.1128/JVI.01112-10)

Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick Borne Dis*. 2011;2(1):2-15. doi:[10.1016/j.ttbdis.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.007)

Suter MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P, Müller EJ. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol*. 2009;20(5-6):515-532. doi:[10.1111/j.1365-3164.2009.00819.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00819.x)

Takashima A, Grinnell F. Fibronectin-Mediated Keratinocyte Migration and Initiation of Fibronectin Receptor Function In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85(4):304-308. doi:[10.1111/1523-1747.ep12276880](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12276880)



Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 2009;227(1):75-86. doi:[10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x)

Tonteri E, Kipar A, Voutilainen L, et al. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS One.* 2013;8(12):e81214. doi:[10.1371/journal.pone.0081214](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081214)

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):133-146. doi:[10.1038/nri1001](https://doi.org/10.1038/nri1001)

Tüzün Y, Antonov M, Dolar N, Wolf R. Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin.* 2007;25(4):467-476, vii. doi:[10.1016/j.det.2007.06.003](https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.003)

Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci.* 2000;24 Suppl 1:S29-38. doi:[10.1016/s0923-1811\(00\)00138-9](https://doi.org/10.1016/s0923-1811(00)00138-9)

Vančová I, Slovák M, Hajnická V, et al. Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. *Parasite Immunology.* 2007;29(4):169-177. doi:[10.1111/j.1365-3024.2006.00931.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00931.x)

Vaňhara P, Sedláčková M, Lauschová I, et al. Histologický atlas LF MU | Lékařská fakulta Masarykovy univerzity. Published 2018. Accessed February 18, 2024. [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js18/histologie\\_atlas/web/index.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js18/histologie_atlas/web/index.html)

Weller RB, Hunter HJA, Mann MW. *Clinical Dermatology*. John Wiley & Sons; 2014.

Wikel S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol.* 2013;4:337. doi:[10.3389/fmicb.2013.00337](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00337)

Wu J, Wang Y, Liu H, et al. Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16606-16613. doi:[10.1074/jbc.M109.094615](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094615)

Zahn S, Rehkämper C, Kümmerer BM, et al. Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN $\lambda$ ) in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 2011;131(1):133-140. doi:[10.1038/jid.2010.244](https://doi.org/10.1038/jid.2010.244)