

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Vliv klíštěcího serpinu IRS-2 na dendritické buňky aktivované  
TLR4 ligandem**

Diplomová práce

**Bc. Šárka Pospíšilová**

Školitelka: Mgr. Jaroslava Liesková, PhD.

České Budějovice 2012

Pospíšilová, Š., 2012: Vliv klíštěcího serpinu IRS-2 na dendritické buňky aktivované TLR4 ligandem. [The effect of tick's serpin IRS-2 on dendritic cells activated by TLR4 ligand. Mgr. Thesis, in Czech.] – 48p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

IRS-2 je inhibitor serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus*. Mým úkolem v této práci bylo zjistit efekt IRS-2 na dendritické buňky aktivované TLR4 ligandem nebo *Borrelia afzelii*. Efekt byl studován na několika úrovních. Zaměřila jsem se na produkci cytokinů, expresi kostimulačních molekul a buněčnou signalizaci. Výsledky naznačují, že IRS-2 může ovlivňovat expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu buněk, ale tato zjištění potřebují další ověření. IRS-2 neovlivnil produkci cytokinů. Vliv IRS-2 na aktivitu p38, Erk1/2 ani NF-κB v buňkách stimulovaných s LPS nebyl pozorován. IRS-2 negativně ovlivnil *B. afzelii* indukovanou fosforylaci transkripčního faktoru STAT 3.

IRS-2 is the inhibitor of serine proteases from the *Ixodes ricinus* tick. My task in this thesis was to find out the effect of the IRS-2 on dendritic cells activated by TLR4 ligand or by *Borrelia afzelii*. This effect was studied on several levels. I focused on the cytokine production, the expression of costimulatory molecules and cell signaling pathways. The results show that the IRS-2 may inhibit the expression of costimulatory molecules CD-80 a CD-86 on the cell surface, but this finding needs to be confirmed again. The production of cytokines was not affected by the IRS-2. The effect of the IRS-2 on the activity of p38, Erk1/2 nor NF-κB in LPS stimulated cells was not observed. The fosforylation of STAT 3 in cells activated by the *B. afzelii* was lowered by the IRS-2.

Práce byla financována z grantu MSMT 590/4016 a z grantu GAČR 590/3154

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

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

České Budějovice, 27.4.2012

.....  
Bc. Šárka Pospíšilová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D., za všechnu pomoc a odborné rady, které mi dala při práci v laboratoři i při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Veronice Slavíkové za kultivaci a pomoc s přípravou borelií i podporu při ELISAách, také RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D. a všem ostatním pracovníkům laboratoře za pomoc při řešení problémů během mé práce. Velký dík patří také panu prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za umožnění práce v laboratoři Imunologie parazitóz. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině a svému příteli za podporu a pomoc při studiu i vypracovávání této práce.

1. Úvod.....	1
1.1 Klíště obecné.....	1
1.1.1 Sliny klíšťat.....	2
1.1.2 IRS-2.....	3
1.2 Dendritické buňky.....	4
1.3 Signální dráhy aktivované Toll-like receptory .....	6
1.3.1 Toll-like receptory.....	6
1.3.2 Signální dráhy zprostředkované NF- $\kappa$ B a MAP kinázami .....	7
1.3.3 Signální dráha fosfatidylinositol-3 kinázy .....	8
1.3.4 JAK-STAT signální dráha .....	9
1.4 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky .....	11
1.4.1 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky stimulované s TLR ligandy .....	11
1.4.2 Borelie .....	12
1.4.3 Vliv klíštěcích slin na boreliemi stimulované dendritické buňky .....	12
2. Cíle práce.....	14
3. Materiály a metody .....	15
3.1 Myši.....	15
3.2 Izolace dendritických buněk magnetickou separací.....	15
3.3 Aktivace dendritických buněk .....	16
3.4 Borelie .....	16
3.5 Přečištění IRS-2 od endotoxinu .....	16
3.6 Příprava proteinového extraktu.....	17
3.7 SDS Polyakrylamidová gelová elektroforéza .....	18
3.8 Western blot.....	18
3.9 Průtoková cytometrie .....	20
3.10 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) .....	20
3.11 Zpracování výsledků .....	20
4. Výsledky.....	21
4.1 Vliv IRS-2 na expresi cytokinů po stimulaci s LPS.....	21
4.1.1 TNF- $\alpha$ .....	21
4.1.2 IL-12 .....	21
4.1.3 IL-10 .....	22
4.2 Vliv IRS-2 na expresi kostimulačních molekul po stimulaci s LPS .....	23
4.3 Vliv samotného IRS-2 na signální dráhy.....	29
4.4 Vliv IRS-2 na signální dráhy po stimulaci s LPS .....	32
4.5 Vliv IRS-2 na JAK-STAT dráhu po stimulaci s LPS nebo boreliemi v dendritických buňkách .....	36
5. Diskuse .....	40
6. Závěr .....	43
7. Seznam použitých zkratk.....	44
8. Použitá literatura .....	46

V celé práci je použita řada zkratk a výrazů, převzatých z angličtiny, které nemají český ekvivalent, ani je není dost dobře možné stručně opsat. Seznam těchto zkratk je na stránce 44.

# 1. Úvod

## 1.1 Klíště obecné

Klíšťata (Ixodida) patří do třídy Arachnida, podkmenu Chelicerata, kmenu Arthropoda a říše Animalia. Jsou obligátní hematofágní ektoparazité. Klíšťata jsou výrazně větší než ostatní roztoči a také se liší tím, že mají speciální ústní ústrojí, takzvaný hypostom. Další jejich odlišností je, že parazitují na obojživelnících, plazech, ptácích i savcích. Klíšťata patří mezi hemimetabola, proto se všechna vývojová stádia podobají dospělci. Z vajíčka se líhnou šestinohé larvy, které se vyvíjí v osminohé nymfy a dospělce (Goodman, 2005).

Klíšťata žijí po celém světě a patří mezi významné vektory při přenosu některých nemocí v Asii, Evropě a Americe (Hovius, 2008). Vyskytují se především v listnatých či smíšených lesích, křovinách a na vlhkých loukách (Rizzoli, 2011). Klíšťata přenáší virové (klíšťová encefalitida), bakteriální (Lymeská borelióza) i protozoální (tularémie) infekce (Goodman, 2005). Larva se většinou nakazí sáním na infikovaném živočichovi. Infekce v klíštěti přežívá i přeměnu z larvy na dospělce, čili mohou šířit infekce dál (Hovius, 2009).

Ixodida se dělí na Argasidae a Ixodidae. Argasidae („soft ticks“) sají méně než jednu hodinu a i dospělci sají opakovaně. Argasidae prochází několik nymfálních stádií (v závislosti na druhu) a jejich životní cyklus může trvat od několika měsíců až po roky. Většinou mají během života za hostitele stále stejný druh zvířat a často se zdržují v jejich hnízdech či úkrytech. Rozmnožují se mimo hostitele. Ixodidae („hard ticks“) sají od několika dní až po týden, dospělá samice saje pouze jednou a po naklazení vajíček umírá. Ixodidae vystřídají tři různé hostitele a jejich vývoj trvá minimálně jeden rok. Mají hřbetní štítek, který u dospělých samců překrývá celý hřbet a u larev, nymf a samic překrývá pouze přední část hřbetu. Páří se během sání na hostiteli (Samuel, 1971). Ixodidae se dále dělí na metastriate a prostriate. Metastriate mají krátké sací ústrojí a produkují lepidou látku, kterou se přidržují k hostiteli. Prostriate mají delší sací ústrojí a přichycují se na hostitele bez použití dalších látek (Francischetti, 2009).

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) patří do Prostriata a je významným přenašečem infekcí v Evropě. Klíště obecné je non-nidikolní (nesetrvává v hnízdech či úkrytech hostitelů) a proto musí hostitele aktivně vyhledávat. Aby našlo hostitele, leze na stébla trav a na listy rostlin a křovin, kde čeká přichycené třemi zadními páry nohou a s nataženými předními nohama, kterými se zachytí na srsti nebo oděvu. K rozpoznání hostitele klíšťata používají řadu vjemů – vnímají teplo, různé chemické signály jako je CO<sub>2</sub> v dechu a vibrace (Goodman, 2005; Rizzoli, 2011).

### 1.1.1 Sliny klíšťat

Slinné žlázy slouží klíštěti k metabolismu vody, iontů a také k sání krve. Klíště vylučuje vysoce hygroskopické sliny, kterými získává vodu ze vzdušné vlhkosti a tím je mu umožněno přežít i velmi dlouhé období bez přísátí na hostitele. Při sání krve vylučuje klíště přes slinné žlázy vodu z krve zpět do hostitele a tím zahušťuje krev ve svém trávicím ústrojí. V průběhu vývoje parazit-hostitel začalo klíště ve slinách produkovat mnoho složek, které ovlivňují reakci hostitele (Francischetti, 2009). Tyto fyziologicky aktivní proteiny ovlivňují koagulaci, fibrinolýzu, imunitu, zánět a angiogenezi a tím pomáhají udržet klíště při sání na hostiteli i přenosu patogenů. Klíštěcí sliny obsahují antikoagulancia a inhibitory tkáňového faktoru, trombinu, komplementu, T-lymfocytů i B-lymfocytů (Hovius, 2008).

Inhibovat některé funkce imunitního systému jako je aktivace komplementu, fagocytóza, produkce zánětlivých cytokinů a oxidu dusičného makrofágy, produkce superoxidu v neutrofilech, aktivita NK buněk a proliferace T- i B-lymfocytů mají schopnost jak klíštěcí sliny, tak extrakt ze slinných žláz. Klíštěcí sliny také přepínají imunitní odpověď na Th2 typ, což se projevuje zvýšenou produkcí IL-4 a IL-10 a sníženou produkcí IL-12 a IFN- $\gamma$  (Kopecký, 1998; Skallová, 2008).

Další z pochodů, se kterým se krev sající členovci musí vypořádat je svědění, pálení nebo bolest. ATP uvolňující se z poškozených buněk je jedním z mediátorů bolesti, mezi další patří serotonin a histamin, které jsou uvolňovány destičkami a žírnými buňkami. V klíštěcích slinách je obsažen enzym apyráza štěpící ATP, lipocaliny, které ruší účinek serotoninu a histaminu a také peptidázy ničící specificky bradykinin, který je produkován neutrofilly (Francischetti, 2009).

Klíštěcí sliny obsahují velmi komplexní škálu proteinů, přičemž mnoho proteinů je z multigenových rodin. U některých rodin se produkce proteinů mění v průběhu sání. Mezi významné rodiny proteinů patří:

**Glycin- nebo prolin-bohaté, kolagenu podobné proteiny.** Mezi ně patří proteiny, které jsou v kutikule a matrixu slinných žláz. Další zajišťují imunitu klíštěte a jeho přilepení k hostiteli (u metastríata) nebo napodobují proteiny v hostitelské pokožce.

**Muciny** jsou serin- a threonin-bohaté proteiny. Jejich funkcí je obalit chitinové části ústního ústrojí klíštěte a tím je schovat před imunitním systémem hostitele.

**Ixoderginová superrodina** je rodina cystein-bohatých proteinů, které brání vazbě destiček s fibrinogenem a tím brání tvorbě sraženiny.

**Proteiny obsahující Kunitzovu doménu** inhibují proteázy z S1 rodiny a působí protisrážlivě.

**Serpin domain rodina** obsahuje inhibitory serinových proteáz (serpiny), které jsou exprimovány u všech živočichů a mají velmi důležitou roli při imunitní odpovědi a zánětu. U obratlovců kontrolují srážlivost krve a u bezobratlých aktivitu profenol-oxidázy, která se účastní imunitních reakcí. Inhibují faktor Xa. Na tyto proteiny byly cíleny pokusy ke získání protiklíštěcí vakcíny, ale zatím bez úspěchu (Francischetti, 2009). Bylo identifikováno více než 60 serpinů, většinou z *I. scapularis*, ale pouze dva z *I. ricinus* byly charakterizovány. Prvním je serpin Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor), který má imunosupresivní vlastnosti, inhibuje elastázu a tím snižuje hemostázu obratlovců a inhibuje produkci několika zánětlivých cytokinů (Prevot, 2006). Druhým je IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin 2), který charakterizoval Chmelař (2011) a o kterém budu psát v samostatné kapitole.

**Cystatiny** jsou inhibitory cysteinových proteáz. Funkčně charakterizováno bylo několik cystatinů, z nich dva cystatiny z *Ixodes scapularis*: sialostatin L a sialostatin L2. Oba mají imunosupresivní a protizánětlivé funkce.

**Lipocaliny** jsou všudypřítomné proteiny, které nesou hydrofobní ligandy uvnitř  $\beta$ -barelu. U klíšťat jsou velmi silně produkovány do slin a váží histamin a serotonin, také inhibují komplementovou kaskádu a váží imunoglobuliny.

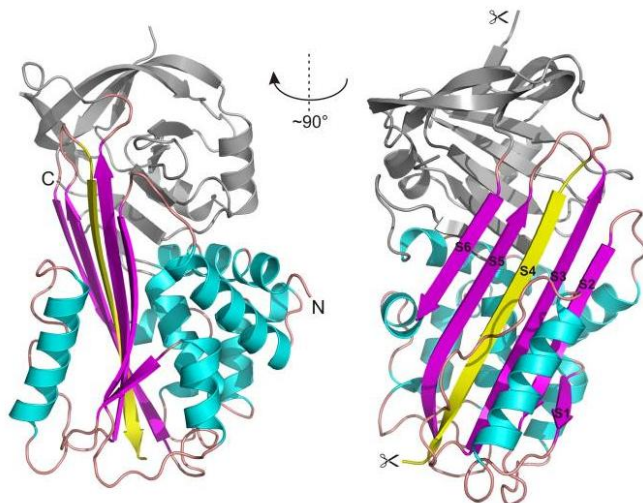
V klíštěcích slinách je mnoho **enzymů**, například apyráza, která štěpí ATP uvolněné z poškozených buněk. Mezi další enzymy patří esterázy, glukosidázy, fosfolipáza A<sub>2</sub>, anafylatoxin-inaktivující enzym a fibrin a fibrinogen specifická metaloproteáza.

Mnoho dalších proteinů je příbuzných s produkty imunitního systému. Mezi ně patří proteiny rozpoznávající peptidoglykany, ixoderiny, lysozomy, defensiny a další.

V klíštěcích slinách jsou i neproteinové složky jako jsou vazodilatující prostaglandiny a kanabinoidy působící protizánětlivě a proti bolesti (Francischetti, 2009).

### 1.1.2 IRS-2

IRS-2 je serpin ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Jeho struktura je podobná struktuře ostatních serpinů – obsahuje tři velké  $\beta$ -listy a devět  $\alpha$ -helixů (Obr. 1). V jeho krystalu jsou dva nesymetrické proteiny v konformaci zvané relaxovaný stav serpinů, při kterém je rozštěpena smyčka reaktivního centra (reactive center loop), což se děje v důsledku kontaminace při krystalizaci (Chmelař, 2011).



**Obrázek 1.:** Struktura IRS-2 (Chmelař, 2011).

Na vysokou specifičnost proteinu ukazuje to, že neinhibuje všechny serinové proteázy, které jsou spojené s koagulací nebo zánětem. Neinhibuje například plasmin, elastázu, proteinázu 3 a faktory Xa a XIa. Také byla zkoumána vazba IRS-2 na myší proteázu 4, která je funkčním homologem lidské chymázy. Inhibiční schopnost IRS-2 se potvrdila *in vitro* i *in vivo*. Byly detekovány komplexy IRS-2 s proteázou 4. Následně byla ověřena inhibice cathepsinu G a jeho schopnosti agregovat destičky. Při velkém nadbytku IRS-2 inhiboval i agregaci zprostředkovanou kolagenem, ale jiné cesty agregace zůstaly nezasazené, což opět ukazuje na jeho vysokou specifičnost. Zajímavým pozorováním byla schopnost IRS-2 inhibovat otok a příliv neutrofilů do zanícené tkáně u myší. Také bylo zjištěno, že exprese mRNA IRS-2 se v průběhu sání klíštěte mění. Druhý den sání byla hladina mRNA 9x vyšší než u nenasátého klíštěte a po šesti dnech byla hladina 36x vyšší .

IRS-2 interaguje s proteázami pro serpiny typickou sebevražednou inhibicí (suicide inhibition). Se serinovými proteázami tvoří nevratný komplex, při jehož vzniku dochází ke štěpení ve smyčce reaktivního centra IRS-2.

Striktní specifičnost a znalost struktury IRS-2 může být základem pro jeho použití ve farmakologii (Chmelař, 2011).

Účinky IRS-2 na dendritické buňky nebyly zatím popsány.

## 1.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou odvozeny z prekurzorů z kostní dřeně a mohou pocházet z lymfoidní i myeloidní linie. Některé mohou být odvozeny od monocytů, jiné se mohou přeměnit v Langerhansovy buňky. Dendritické buňky patří mezi antigen prezentující buňky, které aktivují adaptivní imunitní odpověď. Zároveň ale samy fagocytují, čili představují



spojení mezi antigenně nespecifickou a specifickou imunitou. Dendritické buňky jsou ve všech tkáních, hlavně na rozhraní organismu s vnějším prostředím. Nejvíce jich je v kůži a sliznicích trávicího a dýchacího ústrojí, kde aktivně vyhledávají antigeny. Nezralé dendritické buňky neustále migrují mezi orgány, krví a lymfou. Když v těle není infekce, fagocytují odumřelé buňky a ty zpracovávají a prezentují jejich části s MHC (hlavní histokompatibilní komplex). Tím, že prezentují tělu vlastní antigeny, přispívají k zachování tolerance k autoantigenům (Lipscomb, 2002).

Nezralé dendritické buňky jsou aktivovány podnětem, který rozpoznají jako nebezpečný pro organismus, tím jsou většinou patogenní mikroorganismy nebo nekrotické buňky. Mezi receptory, které rozpoznávají molekulární vzory spojené s patogeny (pathogen-associated molecular patterns) patří Toll-like receptory, NOD-like receptory a lektinové receptory C-typu (van Vliet, 2007). Toll-like receptory (TLR) jsou nejdůležitější při rozpoznávání patogenních motivů. Všechny TLR jsou downregulovány při maturaci, což naznačuje, že pouze nezralé dendritické buňky jsou schopny reagovat na mikrobiální produkty (Lipscomb, 2002).

Aktivace dendritických buněk vede k jejich maturaci a s ní spojenou migrací do lymfatických tkání, ztrátou schopnosti fagocytovat a zvýšenou expresí MHC a kostimulačních molekul (CD80, CD86). Navíc začnou produkovat cytokiny, které jsou potřeba pro aktivaci T-lymfocytů (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 a TNF- $\alpha$ ). Dendritické buňky, produkující protizánětlivý cytokin IL-10 aktivují Th2 typ imunitní odpovědi zatímco, prozánětlivé cytokiny IL-12 a TNF- $\alpha$  polarizují imunitní odpověď k Th1 typu. Zralé dendritické buňky jsou jako jediné buňky v těle schopny aktivovat naivní T-lymfocyty. Ireverzibilní maturace trvá 48 hodin a po dalších 2-3 dnech, kdy aktivují naivní T-lymfocyty, hynou apoptózou. Dendritické buňky také produkují cytokiny potřebné pro maturaci a diferenciaci B-lymfocytů (Hořejší, 2005; Lipscomb, 2002).

Dendritické buňky prezentují antigen na MHC. Aby k tomu mohlo dojít, jsou antigeny nejprve fagocytovány a degradovány v proteozomech, dále prochází přes endoplazmatické retikulum, kde se váží na MHC a pak jsou vezikulami transportovány na povrch buňky (Ferenčík, 2000).

K aktivaci T-lymfocytů jsou potřeba dva signály. Jako první signál slouží antigen navázaný na MHC a jako druhý signál jsou potřeba kostimulační molekuly (CD80 a CD86) na povrchu dendritické buňky (Hořejší, 2005). CD86 je pravděpodobně znakem časně maturace, zatímco CD80 je až u úplně zralých dendritických buněk (Lipscomb, 2002).

Morfologicky se dendritické buňky podobají neuronům, protože mají četné výběžky cytoplazmy, ale uvnitř mají endozomy, lysozomy a granula potřebná ke zpracování antigenů.

Dendritické buňky jsou zkoumány jako možná imunoterapeutika. Jednou z možností je jejich přidávání do vakcín jako adjuvans. Další možností je jejich použití při léčbě rakoviny a autoimunitních chorob (Lipscomb, 2002).

## 1.3 Signální dráhy aktivované Toll-like receptory

### 1.3.1 Toll-like receptory

Toll-like receptory jsou membránové receptory, které, jak bylo zmíněno dříve, rozpoznávají různé patogeny a o jejich přítomnosti šíří signál buňkou a tím aktivují imunitní odpověď. Jsou pojmenovány po genu Toll pro receptor, který u *Drosophila* představuje obranu proti plísním. O něco později byl nalezen homolog u savců, který ovlivňoval expresi genů odpovědných za zahájení zánětlivé reakce. Po objevu dalších příbuzných struktur byla skupina pojmenována Toll-like receptory (Takeda, 2004).

U savců je minimálně 11 TLR s tím, že TLR 1-9 jsou konzervované a stejné u myši a člověka. Část receptoru v cytoplasmě je velmi podobná IL-1 receptorové rodině a proto je tato část označována jako TIR (Toll/IL-1 receptor) doména. Extracelulární struktury jsou rozdílné, Toll-like receptory mají extracelulární oblast bohatou na leuciny, zatímco IL-1 jsou podobné imunoglobulinům (Takeda, 2005). Je známo, že jednotlivé TLR jsou důležité pro rozpoznávání specifických složek patogenů, jako jsou bakterie, plísně, prvoci a viry, které jsou u nich konzervované, ale nevyskytují se u savců (Takeda, 2004).

**TLR1** ve spojení s TLR2 rozpoznává triacylované lipoproteiny například z *Borrelia burgdorferi*.

**TLR2** rozpoznává mnoho bakteriálních složek, mezi které patří lipoproteiny, kyselina lipoteichová (LTA) z gram-pozitivních bakterií, ale také zymosan z plísní a další. Jsou dva důvody, proč má TLR2 tak širokou škálu rozpoznávaných molekul. První je, že je velmi často v heterodimeru s TLR1 nebo TLR6, které s ním jsou strukturně podobné. Druhým důvodem je, že TLR2 spolupracuje i s dalšími povrchovými receptory, které mu nejsou strukturně podobné, například s receptory lektinové rodiny.

**TLR3** rozpoznává dsRNA, která se vyskytuje ve virech při replikaci, ale buňky mají i jiné cesty rozpoznávání dsRNA.

**TLR4** rozpoznává LPS (lipopolysacharid) z gram-negativních bakterií a několik endogenních molekul jako heat shock proteiny, oligosacharidy kyseliny hyaluronové,

fibrinogen a některé další. Aby tyto vnitřní signály aktivovaly odpověď TLR4, musí být ve vysoké koncentraci. Oproti tomu koncentrace LPS stačí velmi nepatrná.

**TLR5** je aktivován flagelinem, monomerní součástí bakteriálních bičičků.

**TLR6** ve spojení s TLR2 rozpoznává diacylované lipoproteiny.

**TLR7** a **TLR8** jsou velmi konzervované a rozpoznávají virovou ssRNA. Jsou pouze v endozomech a tudíž se nemohou setkat s tělu vlastní RNA, která se do endozomů nedostane.

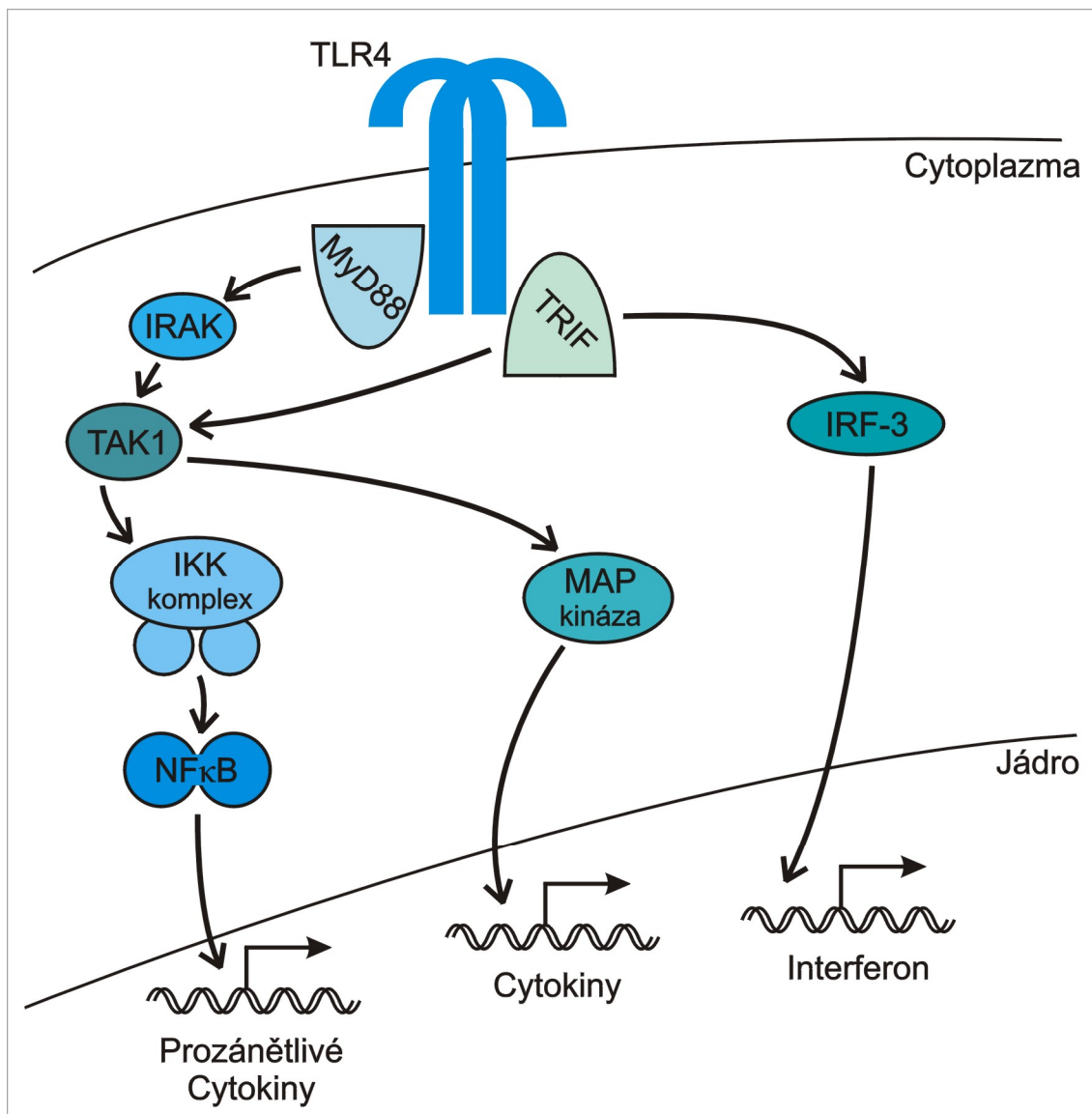
**TLR9** rozpoznává nemetylované CpG motivy, které jsou časté v bakteriální a virové DNA. U obratlovců je CpG motivů málo a cysteiny jsou vysoce metylované. I tak je velmi pravděpodobné, že se TLR9 zúčastní vzniku některých autoimunitních chorob jako je systémový lupus erythematosus (Takeda, 2005).

TLR 1, 2, 4 a 5 jsou na povrchu buněk a TLR 3, 7, 8 a 9 jsou v endozomech a potřebují, aby byl patogen fagocytován (van Vliet, 2007).

Rozpoznání patogenů Toll-like receptory vede k expresi genů pro zánětlivé cytokiny a kostimulační molekuly. S prezentací antigenů vede tento děj k aktivaci antigeně specifické imunitní odpovědi (Takeda, 2005).

### **1.3.2 Signální dráhy zprostředkované NF- $\kappa$ B a MAP kinázami**

Při rozpoznání patogenu dojde k dimerizaci TLR, která vede k aktivaci signálních drah v cytoplazmě (Obr. 2), kde jsou dvě možné cesty. Cesta zprostředkovaná adaptorem MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), která je obdobná jako u IL-1 receptorů. Jde o kaskádu fosforylací, která vede přes kinázy IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) a TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1). Výsledkem je aktivace MAP (mitogen activated protein) kináz a NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) (Takeda, 2005). Mezi MAP kinázy patří Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase) a p38 (Watts, 2010). MAP kinázy jsou serin-threoninové kinázy, které dále fosforylují transkripční faktory, čímž ovlivňují jejich aktivitu. NF- $\kappa$ B je transkripční faktor, který je přítomen v cytoplazmě v latentní formě a je inhibován proteinem I $\kappa$ B. I $\kappa$ B je fosforylovaný I $\kappa$ B kinázou (IKK), která je součástí IKK komplexu. Při aktivaci TLR dochází k degradaci I $\kappa$ B a následnému přemístění uvolněného transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra, kde se váže na promotor, což vede k indukci některých cytokinů jako je například IL12p70 a TNF- $\alpha$ . Kromě dráhy zprostředkované MyD88 adaptorem, existuje také TRIF (TIR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) závislá cesta, která vede přes aktivaci transkripčního faktoru IRF-3 a IRF-7 k indukci interferonů typu I. Byla popsána u TLR 3 a 4 (Takeda, 2005).



**Obrázek 2.: Signální dráhy TLR4 receptoru.** K aktivaci TLR4 dochází po rozpoznání LPS, což vede k aktivaci drah přes MyD88 nebo TRIF. Dochází k fosforylaci NF-κB a MAP kináz mezi které patří p38 a Erk1/2. Přes TRIF adaptor dochází k indukci interferonu β.

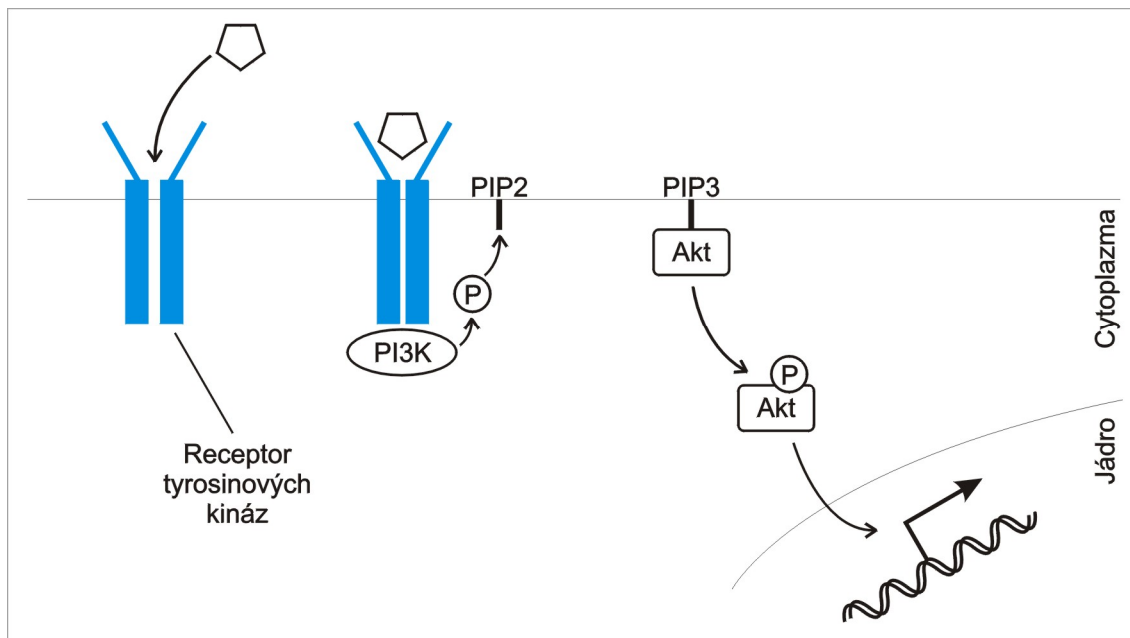
### 1.3.3 Signální dráha fosfatidylinositol-3 kinázy

Další signální dráha, která je aktivována TLR ligandy je zprostředkována fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3-K). Zúčastňuje se mnoha buněčných procesů, mezi které patří buněčný metabolismus, proliferace, diferenciace a přežití buňky (Baselga, 2011).

PI3 kinázy patří do rodiny lipidových kináz, které fosforylují fosfoinositidy v plazmatické membráně. Jsou to heterodimery skládající se z regulační (p85) a katalytické (p110) podjednotky. Jsou aktivovány přes receptory tyrosinových kináz. Aktivovaná PI3 kináza fosforyluje fosfatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) na fosfatidylinositol

(3,4,5)-trisphosphate (PIP3). K PIP3 se váže Akt (serin/threoninová kináza), která je fosforylována a poté stimuluje syntézu proteinů a růst buňky (Obr. 3).

Tato dráha je také často hyperaktivována v při rakovinném bujení (Baselga, 2011)

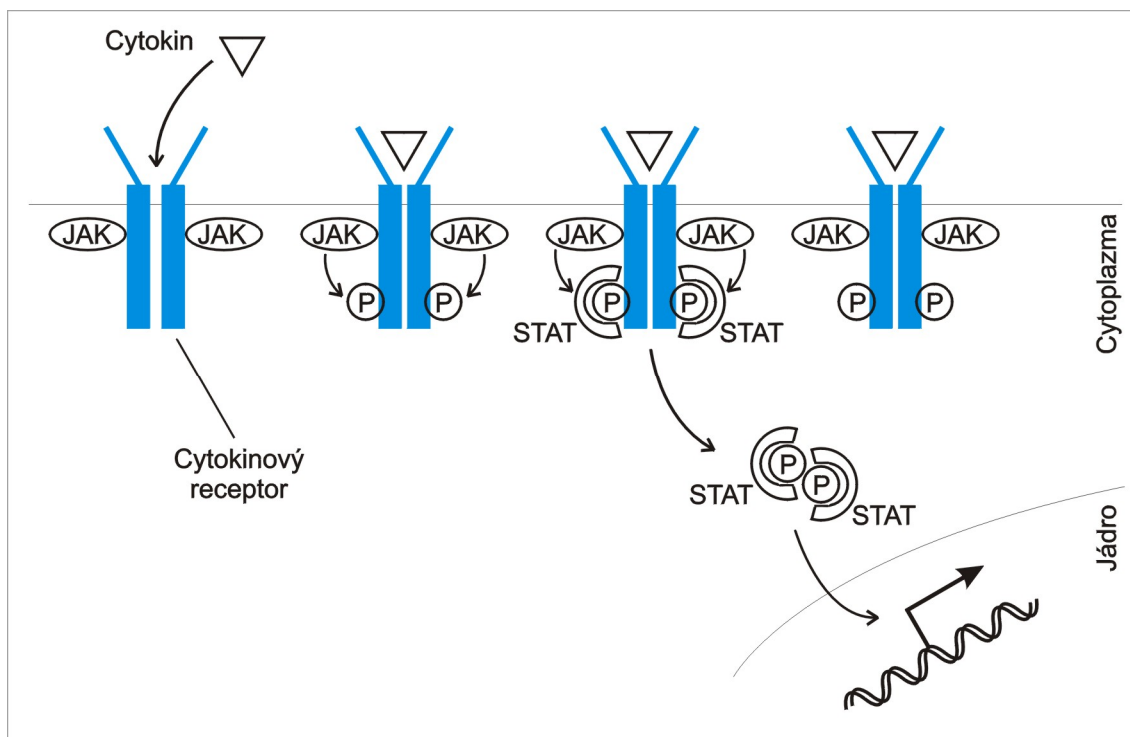


**Obrázek 3.: PI3 kinázová signální dráha.** PI3 kináza fosforlyluje PIP2 na PIP3, na který nasedá Akt, ta je fosforylována a putuje do jádra, kde spouští transkripci.

### 1.3.4 JAK-STAT signální dráha

Mimo výše uvedených drah je aktivována i JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) dráha. Její aktivaci zprostředkují cytokiny vylučované aktivovanými dendritickými buňkami. Přenáší přes cytokinové transmembránové receptory informace extracelulárních signálů přímo do jádra, kde spouští transkripci (Aaronson, 2002). Když receptor zaznamená cytokin, aktivuje JAK, ta fosforyluje receptor, na který se připojí STAT, který je fosforylován na tyrosinu a někdy serinu, což jim dovolí dimerizovat a přesunout se do jádra, kde se váží na určitou konzervovanou sekvenci a aktivují transkripci (Behera, 2004; Murray, 2007) (Obr. 4).

Receptory cytokinové rodiny mohou mít jeden až tři řetězce, které se podílejí na vazbě ligandu a přenosu signálu (Ihle, 1997).



**Obrázek 4.: JAK-STAT signální dráha.** Po rozeznání cytokinu dochází k aktivaci JAK, která fosforyluje receptor, na fosforylovaný receptor přisedne STAT, který je také fosforylován. Fosforylované STATy vytvoří dimer, který putuje do jádra, kde aktivuje transkripci.

U savců jsou čtyři Janus kinázy – JAK1, JAK2, JAK3 a Tyk2, které jsou v různých kombinacích aktivovány různými ligandy receptorů. K aktivaci tyrosin kinázové aktivity Janus kináz je potřeba dimerizace cytoplazmatické domény receptorových řetězců, které svou blízkostí umožní fosforylaci receptorových řetězců Janus kinázami (Ihle, 1995). Jednořetězcové receptory to obcházejí schopností vázat se na dvě místa na ligandu (Ihle, 1997). Po fosforylaci receptorů se vytvoří vazebné místo pro STATy, které jsou Janus kinázami následně fosforylovány. Jakákoli Janus kináza může fosforylovat každý STAT (Ihle, 1995).

Bylo určeno a definováno sedm STATů: STAT 1-4, STAT 5a, STAT 5b a STAT 6 (Epling-Burnette, 2002). Nefosforylovaný STAT se vyskytuje pouze jako monomer, po fosforylaci jsou vždy jako dimer. STATy jsou si navzájem velmi podobné a mohou tvořit i heterodimery. Tím, že každý dimer nebo heterodimer STATů má jinou afinitu k rozpoznávané sekvenci, a že každá buňka exprimuje STATy v různém množství, je zaručena specifita odpovědi na daný signál. Specifita je pravděpodobně také zajištěna tím, že na každý receptor se váže jiný STAT (Ihle, 1995).

Po aktivaci některých TLR dochází k autokrinní produkci  $\text{INF-}\beta$  dendritickými buňkami a k následné aktivaci interferonového receptoru a spuštění JAK-STAT dráhy. Tato

interferonem zprostředkovaná aktivace je důležitá pro maturaci, expresi kostimulačních molekul a prezentaci antigenu na dendritických buňkách (Stetson, 2006).

Několik málo cytokinů vyvolá silnou reakci, která je propojena přes několik dalších proteinů až k MAP kináze nebo PI3-K (Ihle, 1995).

Aktivita STAT proteinů je kontrolována několika způsoby. Aktivované STAT proteiny mohou být inhibovány supresory cytokinové signalizace (suppressors of cytokine signalling - SOCS), jejichž exprese je spouštěna STATy a tudíž slouží jako negativní zpětná vazba. SOCS proteiny také inhibují aktivované Janus kinázy. Fosforylované STATy mohou být defosforylovány cytoplazmatickými nebo jadernými fosfatázami. Dalším prostředkem kontroly jsou proteinové inhibitory aktivovaných STATů (Protein inhibitor of activated STATs - PIAS), které inhibují vazbu STATů na DNA nebo usnadní jejich degradaci (Hendry, 2004).

Mezi kontrolní mechanismy patří i specifické STAT 5 a STAT 6 serinové proteázy, které mohou být inhibovány inhibitory serinových proteáz. Proteázy nerozlišují mezi fosforylovaným a nefosforylovaným STATem a jejich proteolytickým štěpením vznikají neúčinné STATy. STAT 3, STAT 5 a STAT 6 jsou také štěpeny cysteinovou proteázou calpainem (Hendry, 2004).

Serinové proteázy také štěpí STAT 1. Štěpení STAT 1 těmito proteázami vede ke zvýšení jeho schopnosti vázat se na DNA. Jejich aktivita může být inhibována inhibitory serinových proteáz (Dai, 2009).

## **1.4 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky**

### **1.4.1 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky stimulované s TLR ligandy**

Dendritické buňky klíštěti nezpůsobí žádné přímé poškození, ale hrají velmi důležitou roli při tvorbě imunitní odpovědi proti němu (Francischetti, 2009). Skallová a kol. (2008) aktivovali dendritické buňky různými syntetickými TLR-ligandy, aby vyvolali jejich maturaci a zkoumali, jak moc ji ovlivní přítomnost klíštěcích slin. První bylo zjištěno silné snížení schopnosti dendritických buněk inkubovaných s klíštěcími slinami aktivovat naivní T-lymfocyty. Poté byla ověřována schopnost maturace a migrace dendritických buněk *in vivo*. Byl zaznamenán výrazný pokles kožních dendritických buněk v lymfatických uzlinách po 24 hodinách u myši injikovaných klíštěcími slinami oproti kontrolním myším s PBS. Rovněž dendritické buňky vystavené klíštěcím slinám nebo extraktu ze slinných žláz exprimovaly méně molekul MHC II, než ty z kontrolních myší, což svědčí o jejich snížené maturaci. V porovnání s kontrolními myši, dendritické buňky z myši injikovaných

klíštěcími slinami nebo extraktem ze slinných žláz vykazovaly nižší schopnost prezentace antigenu a s ní spojenou aktivací naivních T-lymfocytů. Navíc u kontrolních myší došlo k indukci imunitní odpovědi typu Th1, zatímco myši vystavené slinám indukovaly odpověď typu Th2 (Skallová, 2008).

Dalším experimentem byla zjištěna snížená produkce IL-12p70 dendritickými buňkami aktivovanými LPS a inkubovanými se slinami (Lieskovská, 2012).

### 1.4.2 Borelie

Borelie patří do řádu Spirochaetales, třídy Spirochaetes, kmenu spirochety a domény bakterie. Jsou přenášeny klíšťaty a způsobují Lymeskou boreliózu. Ta patří mezi choroby nejčastěji přenášené členovci na severní polokouli (Rizzoli, 2011). Nemoc byla poprvé popsána v Connecticutu, ale příznaky choroby byly pozorovány dříve i v Evropě. Prvním příznakem je takzvané erythema migrans – zarudnutí kůže s centrálním výbledem v místě přisátí klíštěte. Neléčená nemoc může postihovat nervovou a cévní soustavu i pohybový aparát (Hovius, 2007; Ertel, 2012). V Americe se vyskytuje pouze *Borrelie burgdorferi* sensu stricto, ale v Asii a Evropě se vyskytují ještě *B. garinii* a *B. afzelii*. Jejich nejdůležitějšími přenašeči jsou *I. scapularis*, *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Hovius, 2007; Hovius, 2009).

Během života borelie vystřídají klíšťata, většinou Ixodida, a různé druhy obratlovců, mezi něž patří hlodavci, velcí savci včetně člověka a ptáci. Larva se nakazí sáním na infikovaném zvířeti a po přeměně na nymfu šíří infekci dál na větší zvířata. Přenosu spirochét napomáhá i imunosupresivní účinek klíštěcích slin (Hovius, 2007; Hovius, 2009).

Borelie si vyvinuly mechanismy jak přežít v členovcích i obratlovcích. Mezi ně patří exprese různých proteinů v závislosti na prostředí, ve kterém se zrovna nacházejí. Část z těchto proteinů přímo reaguje s klíštěcími proteiny a další se váží nebo ovlivňují proteiny v obratlovcích (Hovius, 2007).

### 1.4.3 Vliv klíštěcích slin na boreliemi stimulované dendritické buňky

Borelie jsou rozpoznávány několika Toll-like receptory (TLR 1, 2, 5, 7, 8 a 9). TLR2 zprostředkuje indukci zánětlivých cytokinů, zatímco indukce interferonů  $\alpha/\beta$  je závislá na TLR 7, 8 a 9 (Petzke, 2009). Infekce lidských chondrocytů *B. burgdorferi* vede k rychlé fosforylaci p38 během 15-30 minut, ale vyvolává jen velmi malé zvýšení fosforylace Erk1/2. Vyvolána je i fosforylace STAT 3 a STAT 6 během dvou hodin po infekci (Behera, 2004).

Dendritické buňky produkují po přidání borelií několik cytokinů. Vlivem klíštěcích slin na produkci TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-10 se zabývala Slámová (2011). Dendritické buňky



preinkubovala se slinami a přidávala *B. afzelii* k myším dendritickým buňkám. Všechny testované cytokiny byly slinami inhibovány. Počet fagocytyjících dendritických buněk byl v přítomnosti slin také výrazně snížen. Navíc schopnost dendritických buněk vystavených boreliím aktivovat proliferaci naivních CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů byla po přidání klíštěcích slin významně snížena (Slámová, 2011).

Inhibiční schopnost klíštěcích slin byla prokázána i na úrovni signálních drah. Lieskovská (2011) zjistila, že po stimulaci s LPS nebo *B. afzelii* došlo vlivem slin ke snížení fosforylace STAT 1. STAT 1 je fosforylován vlivem autokrinně produkovaného interferonu. Přímý inhibiční vliv slin na IFN signální dráhu byl navíc prokázán, když byly buňky aktivovány rekombinantním IFN- $\beta$  (Lieskovská, 2011).

Další signální dráhy, které byly slinami negativně ovlivněny v dendritických buňkách po stimulaci s TLR2 ligandem nebo boreliemi byly NF- $\kappa$ B, Erk1/2 a PI3-K. To vše naznačuje, že klíštěcí sliny mohou ovlivňovat produkci cytokinů a maturaci dendritických buněk tlumením určitých signálních drah (Lieskovská, nepublikováno).

## 2. Cíle práce

V rámci začínajícího projektu týkajícího se charakterizace účinků IRS-2 na imunitní buňky byly pro mě stanoveny následující cíle:

1. Účinky IRS-2 na dendritické buňky:
  - Vliv IRS-2 na produkci cytokinů dendritickými buňkami po stimulaci s TLR4 ligandem.
  - Vliv IRS-2 na expresi kostimulačních molekul po stimulaci dendritických buněk s LPS na dendritických buňkách.
2. Vliv IRS-2 na aktivaci signálních drah po stimulaci dendritických buněk s LPS.
3. Vlivu IRS-2 na JAK-STAT signální dráhy po aktivaci dendritických buněk boreliemi.

## **3. Materiály a metody**

### **3.1 Myši**

V pokusech byly použity dvouměsíční samice inbredních myši kmenu C57 BL/6 z Charles River Laboratories (Sulzfeld, Německo). Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a následně byla vyjmuta slezina za účelem izolace dendritických buněk.

### **3.2 Izolace dendritických buněk magnetickou separací**

Poté, co byla slezina sterilně vyjmuta a rozstříhána na kousky, následovala inkubace s Liberasou DL (0,25mg/ml, Roche) a DNázou I (0,2mg/ml, Roche) po dobu 30 minut při 37°C. Uvolněné buňky byly přefiltrovány přes 70µm sítko (BD Falcon) a naředěny s MACS pufrem+2% BOFES. Po centrifugaci trvající 10min., 400g, 4°C byl pelet buněk resuspendován v 830µl MACS+2% BOFES a bylo přidáno 50µl CD11c Microbeads (MACS Miltenyi Biotec). Inkubace trvala 15min při 4°C. Poté byly buňky promyty 10 násobným objemem MACS+2% BOFES a centrifugovány 10min. při 400g, při 4°C. Buňky byly následně resuspendovány v 500µl MACS+2% BOFES a nanесeny na kolonku (MACS Miltenyi Biotec). Kolonka byla promyta 3x 3ml MACS+2% BOFES. Poté byla kolonka vytažena z magnetu a dendritické buňky byly eluovány s 5ml RPMI pomocí pístu a spočítané v Bürkerově komůrce. Po centrifugaci (10min., 400g, 4°C) byly buňky resuspendovány v RPMI médiu obsahujícím 10% BOFES, Antibiotic-Antimycotic Solution (10ml/l, PAA The Cell Culture Company), L-Glutamine (200mM, PAA The Cell Culture Company) a 2-Mercaptoethanol (50mM, PAA The Cell Culture Company).

Buňky byly založeny do 24 jamkové (200µl) nebo 96 jamkové destičky (1ml) (TPP Techno Plastic Products) s výslednou koncentrací 1 000 000 buněk na mililitr a inkubovány v inkubátoru při 37°C s 5% CO<sub>2</sub>.

#### **MACS**

1mM EDTA (SIGMA-ALDRICH) v PBS

**BOFES:** Fetal bovine serum gold (PAA-The Cell Culture Company)

#### **Trypanová modř**

0,5% vodný roztok trypanové modři (SIGMA-ALDRICH)

### 3.3 Aktivace dendritických buněk

Buňky byly aktivovány den po izolaci přidáním LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* K-235, SIGMA-ALDRICH) (50ng/ml) nebo přidáním borelií (10 spirochet na 1 buňku) pokud není uvedeno jinak. IRS-2 byl přidáván do výsledné koncentrace 3 $\mu$ M.

24 jamková destička byla použita v případech analyzovaných western blotem. Bylo založeno 1 000 000 buněk v 1ml média na jamku. Následujícího dne bylo z jamek odebráno 820 $\mu$ l a přidáno LPS nebo borelie a IRS-2 a objem jamky byl doplněn do 250 $\mu$ l.

96 jamková destička byla použita v případech pro stanovení koncentrací cytokinů nebo exprese kostimulačních molekul. V případech pro stanovení koncentrací cytokinů bylo založeno 150 000 buněk ve 150 $\mu$ l. Z jamek bylo odebráno 50 $\mu$ l a přidáno LPS a IRS-2 a objem jamky byl doplněn do 150 $\mu$ l. V případě pro stanovení exprese kostimulačních molekul bylo založeno 200 000 buněk v 200 $\mu$ l. Z jamek bylo odebráno 100 $\mu$ l a přidáno LPS a IRS-2 a objem jamky byl doplněn do 150 $\mu$ l.

Po celou dobu experimentu byly buňky umístěny v inkubátoru, kromě času potřebného k manipulaci.

### 3.4 Borelie

Borelie byly kultivovány v termostatu při 34°C v BSK-H médiu (SIGMA-ALDRICH) s 6% králíčím séra a 1% směsí antibiotik pro borelie (SIGMA-ALDRICH). Pro aktivaci buněk bylo nutné znát počet borelií, proto byla koncentrace borelií spočtena dle Magnusona (Magnuson, 1948). Na podložní sklo bylo nanášeno 3,5 $\mu$ l boreliové suspenze a překryto krycím sklem o rozměru 18x18 mm. Poté byl v temném poli optického mikroskopu (zvětšení 400 $\times$ ) 20 $\times$  spočítán počet borelií v zorných polích. Výsledný počet borelií v 1ml byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{Počet bor./ml} = a \cdot 7,7 \cdot 10^5$$

a – průměrný počet borelií z 20 zorných polí.

Borelie počítala a kultivovala Bc. Veronika Slavíková.

Borelie byly následně centrifugovány 15 000g, 30 minut, 10°C, resuspendovány v PBS a opět centrifugovány 15 000g, 30 minut, 10°C. Následně byly resuspendovány v médiu na požadovaný objem přidávaný k buňkám.

### 3.5 Přečištění IRS-2 od endotoxinu

Vzhledem k tomu, že protein byl připraven v bakteriích *Escherichia coli*, bylo nutné přečistit IRS-2 od LPS kontaminace.

Byl k tomu použit Triton X-114 (SIGMA-ALDRICH), který byl pak odstraněn pomocí Bio-Beads SM-2 Adsorbents (BIO-RAD), podle protokolu (Aida, 1990).

### **Příprava kuliček – jejich přečištění od LPS**

Přibližně 2ml kuliček Bio-Beads SM-2 Adsorbents bylo promícháno na vortexu s 5ml methanolu a necháno 3 minuty usadit. Po odsátí methanolu se kuličky míchaly v roztoku A 2 hodiny při 4°C. Následně byl odstraněn roztok A a kuličky byly třikrát promyty roztokem B.

### **Odstranění LPS**

Do roztoku s proteinem byl přidán Triton X-114, aby byl 1% a výsledný roztok byl inkubován 5 minut na ledu. Poté byl roztok důkladně promíchán na vortexu a inkuboval se 10 minut v bloku při 37°C. Roztok byl centrifugován 1min., 15 600g, 37°C a horní fáze byla přenesena do pyrogen-free mikrozkušavky a celý postup byl zopakován ještě jedenkrát.

### **Odstranění přebytku Tritonu X-114**

Z promytých kuliček byl odsát roztok B a byl na ně přidán přečištěný roztok s proteinem. Kuličky s proteinem se míchaly 1 hodinu při 4°C. Poté byly kuličky odstraněny z roztoku pomocí 0,22µm filtru.

#### **Roztok A**

20mM Tris-Cl pH 8  
2% Triton X-114

#### **Roztok B**

20mM Tris-Cl pH 8  
150mM NaCl

### **Stanovení reziduálního LPS v IRS-2**

Po přečištění IRS-2 od LPS byl proveden test na stanovení přítomnosti zbylého LPS. Limulus amebocyte lysate (LAL) test prováděla RNDr. Helena Langhansová, PhD. podle kitu QCL-1000 CHROMOGENIC LAL TEST (LONZA) podle doporučení výrobce. Koncentrace LPS v přečištěném IRS-2 byla 0,25ng/ml. V pokusech byl ředěn 44x. Poté byla změřena koncentrace proteinu Bradfordovou metodou (SIGMA-ALDRICH) a prověřena funkčnost enzymu testem Serine protease inhibition assays popsaném v supplementary methods, Chmelař, 2001.

## **3.6 Příprava proteinového extraktu**

Buňky byly opláchnuty 750µl vychlazeného PBS a lyzovány přidáním 80µl RIPA pufu po dobu 5min. na ledu. Poté byl supernatant odebrán a centrifugován 10min, 20 000g,

při 4°C. Nakonec byl supernatant (proteinový extrakt) přenesen do čistých očíslovaných mikrozkušavek a zamražen nebo rovnou použit.

#### **RIPA pufr**

1%	Nonidet P-40
0,25%	Sodium deoxycholate
1mM	EGTA (Ethylen-glykol tetraacetic acid) (SIGMA-ALDRICH)
150mM	NaCl
50mM	Tris-Cl pH 7,5

Inhibitory proteáz a fosfatáz byly k RIPA pufru přidány těsně před jeho použitím:

10µg/ml	Aprotinin (SIGMA-ALDRICH)
20µM	Leupeptin(SIGMA-ALDRICH)
0,4µM	AEBSF (SIGMA-ALDRICH)
1µg/ml	Pepstatin (SIGMA-ALDRICH)
25mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (SIGMA-ALDRICH)
25mM	NaF (SIGMA-ALDRICH)

### **3.7 SDS Polyakrylamidová gelová elektroforéza**

Proteiny byly separovány v polyakrylamidovém gelu podle Coligana (1992).

Proteinový extrakt byl smíchán s 4x Laemmli pufrém v poměru 3:1 a poté 3 minuty denaturován při 95°C.

Příprava gelu: Byly připravovány 6% nebo 8% polyakrylamidové gely. Mezi dvě umytá a ethanolem odmaštěná skla byl nalit separační gel asi 2cm pod okraj, překrytý butanolem a nechán přibližně 30 minut polymerizovat. Poté byl butanol vypláchnut destilovanou vodou a nalit koncentrační gel. Do gelu byl zasunut hřebínek a gel byl opět nechán polymerizovat přibližně 15 minut.

Zpolymerizovaný gel byl umístěn v elektroforetické aparatuře naplněné elektroforetickým pufrém. Po nanesení stejného objemu proteinových vzorků byly proteiny separovány v elektroforetickém poli při konstantním proudu 2mA/cm<sup>2</sup>.

Roztoky jsem používala podle Coligana (1992).

### **3.8 Western blot**

Proteiny z gelu byly přeneseny na nylonovou membránu (GeneTiCA) v elektroblotovací aparatuře podle Coligana (1992). Do zavírací mřížky byl sestaven takzvaný blotovací sendvič: houbička, 3 filtrační papíry, membrána navlhčená v metanolu, polyakrylamidový gel, 3 filtrační papíry a houbička. Přenos proteinu na membránu probíhal 90 minut za stálého chlazení při 140V a 250mA.

Poté byla membrána opláchnuta v TBS a 2 hodiny na rotátoru blokována v blokovacím pufru při laboratorní teplotě. Přes noc se membrána inkubovala s primární protilátkou naředěnou v blokovacím pufru při 4°C na rotátoru. Poté byla membrána promývána na

rotátoru 10 minut a 2x 5 minut v TBST při laboratorní teplotě. Po promytí se membrána 1 hodinu inkubovala na rotátoru v laboratorní teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou naředěnou v blokovacím pufru. A opět byla promývána na rotátoru 10 minut a 2x 5 minut v TBST. Proteiny byly vizualizovány chemiluminiscenční metodou za použití Pierce ECL Western Blotting Substrate kitu (THERMO SCIENTIFIC) podle návodu výrobce. Po 1-2 minutové inkubaci s vyvolávacím roztokem byla membrána osušena a zabalena do potravinářské fólie. Chemiluminiscence byla detekována v přístroji FUJI LAS-3000 s programem FUJI FILM Luminiscent Image Analyse LAS-3000.

Za účelem opakovaného použití membrány byla v některých experimentech membrána promyta (stripována) v odmyvacím roztoku (Striping buffer, THERMO SCIENTIFIC), čímž se odstranily navázané protilátky. Membrána se inkubovala ve striping pufru 15 minut při laboratorní teplotě na rotátoru a poté byla promyta 15 minut v TBST a 15 minut v TBS. Následně byla membrána opět blokována 30 minut v blokovacím pufru a inkubována s protilátkami.

Roztoky jsem používala podle Coligana (1992).

**TBST** - Tris buffered saline + 1% Tween 20

**Blokovací pufr:** 5% odtučněné sušené mléko v 1x TBST

**Tabulka 1.:** Tabulka použitých protilátek

Protilátka proti	Velikost [kDa]	Fosforylace aminokyseliny	Výrobce	Původ	Ředění	Příprava gelu [%]
Akt	60	Ser473	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	8
Erk1/2	50-40		Enzo Life Sciences	Rabbit	1:5000	8
GAPDH	37		SANTA CRUZ Biotechnology	Mouse	1:200	8
IκB	39		Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	8
Fosfo-NF-κB	65	Ser536	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	8
p38	38		Enzo Life Sciences	Mouse	1:200	8
Fosfo-p38	38	Thr180,Tyr182	Enzo Life Sciences	Rabbit	1:1000	8
Fosfo-Erk1/2	44,42	Thr202/185, Tyr204/187	Enzo Life Sciences	Rabbit	1:1000	8
Fosfo-STAT1	84,91	Tyr701	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
Fosfo-STAT2	113	Tyr690	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
Fosfo-STAT3	79,86	Tyr705	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
Fosfo-STAT6	110	Tyr641	Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
STAT1	84,91		Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
STAT2	130		Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
STAT3	79,86		Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
STAT6	110		Cell Signaling TECHNOLOGY	Rabbit	1:1000	6
Sekundární protilátka						
anti-Rabbit			Cell Signaling TECHNOLOGY	Goat	1:2000	
anti-Mouse			Cell Signaling TECHNOLOGY	Horse	1:2000	

### 3.9 Průtoková cytometrie

Buňky byly uvolněny z kultivační destičky inkubací s 0,2% EDTA v PBS po dobu 20min. na ledu. Buňky byly odebrány z jamek a 1x promyty s promývacím pufrem a centrifugovány, 10min., 400g při 4°C. Po centrifugaci byly promyty promývacím pufrem a opět centrifugovány 400g, 10min., 4°C. Poté byly značeny protilátkami konjugovanými s fluorochromy: anti-CD11c-APC (Allophycocyanin – červená fluorescence) (eBioscience), anti-CD80-FITC (Fluorescein Isothiocyanate – zelená fluorescence) (eBioscience) a anti-CD86-PE (Phycoerythrin – žlutá fluorescence) (eBioscience) v ředění 1:100 inkubací trvající 20 minut na ledu ve tmě. Poté byly buňky opět 2x promývány promývacím pufrem a centrifugovány 400g, 10min., 4°C. Buněčný pelet byl resuspendován v promývacím pufru a buňky byly analyzovány v průtokovém cytometru (BD FACSCanto<sup>TM</sup>II). Pomocí programu BD FACSDiva Software byly vybrány buňky pozitivní na CD11c molekulu a byla u nich provedena analýza exprese CD80 a CD86 molekul.

Na každý experiment bylo kromě vzorků potřeba 500 000 nestimulovaných neznačených buněk na nastavení průtokového cytometru a po 100 000 nestimulovaných buněk na značení s protilátkami konjugovanými s FITCem (eBioscience) nebo s PE (eBioscience), které sloužily jako izotypová kontrola. Jako kompenzační kontrola byla použita směs nestimulovaných značených a neznačených buněk.

**Promývací pufr:** PBS+1% BOFES

### 3.10 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Byl používán Ready-Set-GO! ELISA Set od e-Bioscience a bylo postupováno podle návodu výrobce. Rekombinantní proteiny a vzorky byly ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Absorbance byla měřena při 450nm na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy).

### 3.11 Zpracování výsledků

Pomocí programu NIH Image J byla provedena densitometrická analýza obrázků z western blotu.

Pro statistické zpracování dat byl použit Studentův t-test.  $p \leq 0,05$  bylo považováno za statisticky signifikantní.



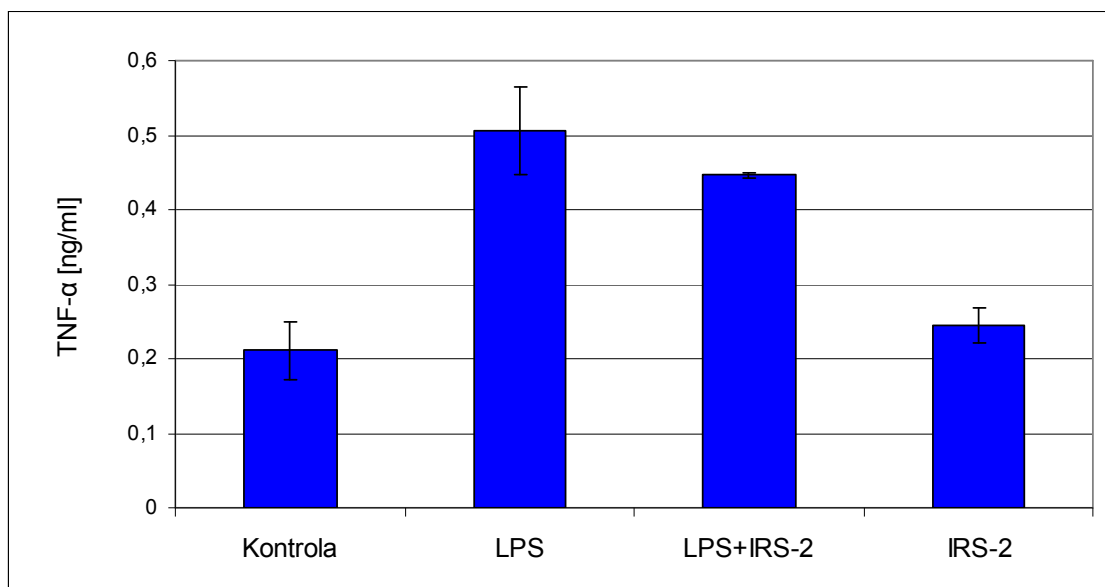
## 4. Výsledky

### 4.1 Vliv IRS-2 na expresi cytokinů po stimulaci s LPS

Abych zjistila, zda má IRS-2 vliv na produkci cytokinů dendritickými buňkami, stimulovala jsem je s 50ng/ml LPS v přítomnosti 3 $\mu$ M IRS-2 po dobu 3, 24, 48 a 72 hodin. Poté jsem měřila koncentraci cytokinů v supernatantu metodou ELISA. LPS a IRS-2 jsem přidávala ihned po vyizolování buněk. Ke každému experimentu jsem měla duplikáty nebo triplikáty.

#### 4.1.1 TNF- $\alpha$

Jako jeden z prozánětlivých cytokinů jsem vybrala TNF- $\alpha$ , který je produkován dendritickými buňkami po stimulaci přes TLR4. Koncentrace TNF- $\alpha$  byla analyzována 3 a 24 hodin po přidání LPS. Po třech hodinách nebyla koncentrace TNF- $\alpha$  patrná (data nejsou prezentována). Po 24 hodinách bylo naměřeno 0,5ng/ml cytokinu (Graf 1). IRS-2 snížil množství produkovaného TNF- $\alpha$  o 0,05ng/ml, ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti ( $p=0,206$ ). Při opakování experimentu jsem nezaznamenala žádný vliv IRS-2 na množství produkovaného TNF- $\alpha$ . Tudíž jsem došla k závěru, že IRS-2 neovlivňuje produkci TNF- $\alpha$ .

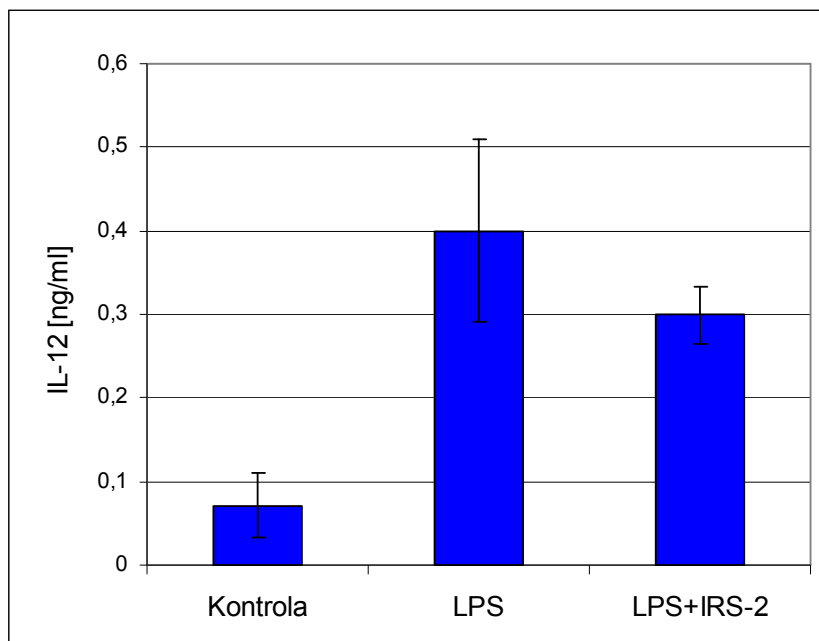


**Graf 1.:** Vliv IRS-2 na produkci TNF- $\alpha$  v dendritických buňkách po stimulaci s LPS po 24 hodinách.

#### 4.1.2 IL-12

Jako další prozánětlivý cytokin jsem si vybrala IL-12. Analyzovala jsem ho po 72 hodinách. Vzhledem k tomu, že po stimulaci s LPS nebyl IL-12 detekovatelný, byl k LPS přidán interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (5ng/ml), čímž se indukovalo měřitelné množství IL-12. Po

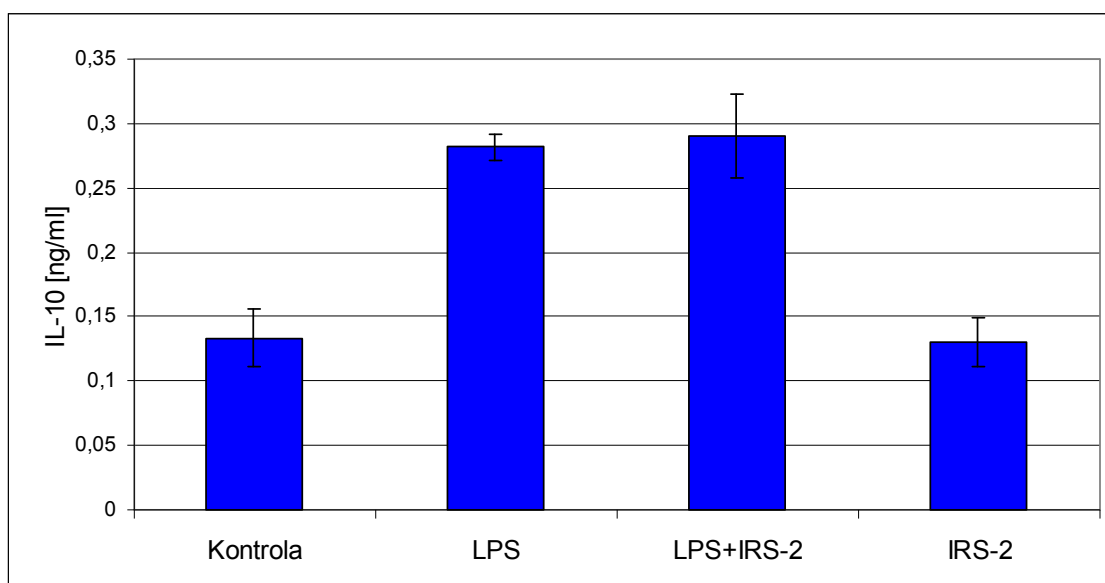
stimulaci dendritických buněk s LPS a IFN- $\gamma$  byla koncentrace IL-12 0,4ng/ml. Množství IL-12 bylo v přítomnosti IRS-2 sníženo o 0,1ng/ml, (Graf 2) ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti ( $p=0,167$ ). Při opakování experimentu nebyl rozdíl množství IL-12 vlivem IRS-2 zaznamenán.



**Graf 2.:** Vliv IRS-2 na produkci IL-12 v dendritických buňkách po stimulaci s LPS po 72 hodinách.

#### 4.1.3 IL-10

Jako protizánětlivý cytokin jsem si vybrala IL-10, jehož koncentraci jsem měřila po 48 hodinách stimulace buněk s LPS v přítomnosti IRS-2. Množství produkovaného IL-10 nebylo ovlivněno IRS-2 (Graf 3). Experiment byl zopakován dvakrát ( $p=0,233$  a  $p=0,378$ ).



**Graf 3.:** Vliv IRS-2 na produkci IL-10 v dendritických buňkách po stimulaci s LPS po 48 hodinách.

Po těchto měřeních koncentrací cytokinů jsem došla k závěru, že IRS-2 signifikantně neovlivňuje produkci cytokinů dendritickými buňkami stimulovanými s LPS.

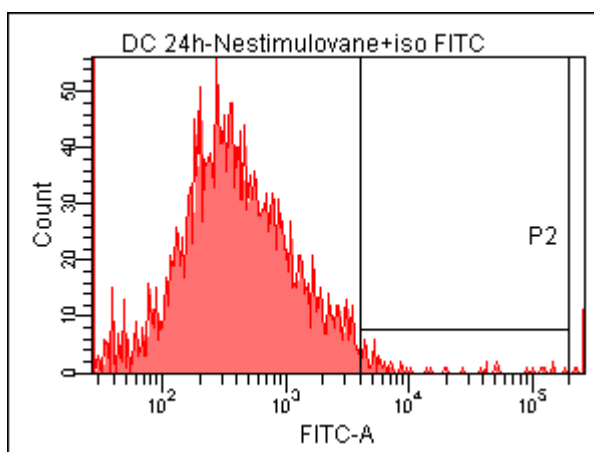
## 4.2 Vliv IRS-2 na expresi kostimulačních molekul po stimulaci s LPS

Schopnost dendritických buněk prezentovat antigen závisí na expresi kostimulačních molekul, jejichž exprese je zvýšena po aktivaci buněk. Zvýšená exprese kostimulačních molekul částečně závisí na chymotrypsin-like aktivitě, jak bylo publikováno (Naujokat, 2007). Vzhledem k faktu, že IRS-2 inhibuje chymotrypsin-like aktivitu (Chmelař, 2011), rozhodla jsem se, že otestuji vliv IRS-2 na expresi kostimulačních molekul po stimulaci s LPS. V tomto experimentu jsem využívala průtokové cytometrie. 3 $\mu$ M nebo 6 $\mu$ M IRS-2 a 100ng/ml LPS jsem přidávala ihned po izolaci dendritických buněk.

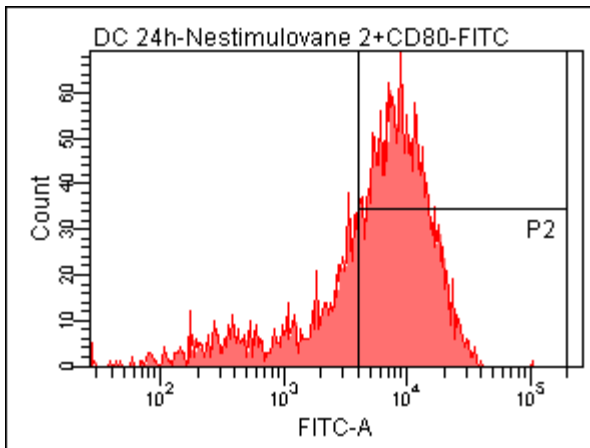
V pilotních experimentech jsem testovala protilátky proti kostimulačním molekulám a schopnost indukovat zvýšení exprese kostimulačních molekul na buňkách stimulovaných s LPS. Poté jsem přistoupila k samotnému testování IRS-2 na zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86. Při prvním pokusu jsem sledovala expresi po 24 hodinách. U buněk s 3 $\mu$ M IRS-2 byla exprese CD80 snížena o 24% oproti buňkám stimulovaným pouze s LPS. Exprese CD86 byla snížena o 4% (data nejsou prezentována).

V následujícím pokusu jsem již používala duplikáty nebo triplikáty a také jsem přidala sledování po 48 hodinách. Po 24 hodinách nebyla exprese CD80 výrazně ovlivněna (pokles o 10% bez statistické významnosti ( $p=0,143$ ), viz histogramy 1-4 a graf 4. Buňky pozitivní na zelenou fluorescenci (FITC) představuje populace P2. Graf 4 znázorňuje průměr mediánů fluorescence.

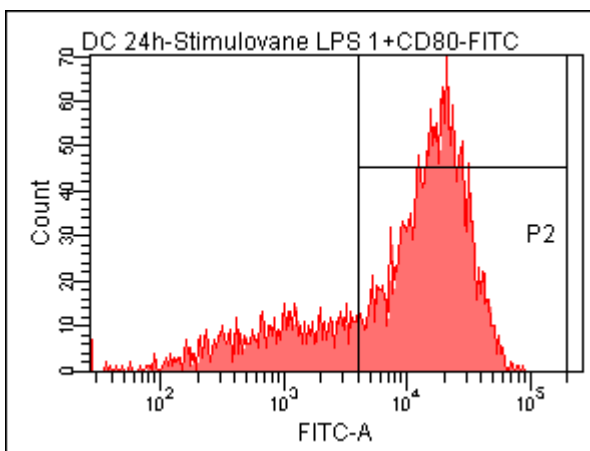
Expresce CD86 nebyla ovlivněna IRS-2 po 24 hodinové stimulaci s LPS (data nejsou prezentována).



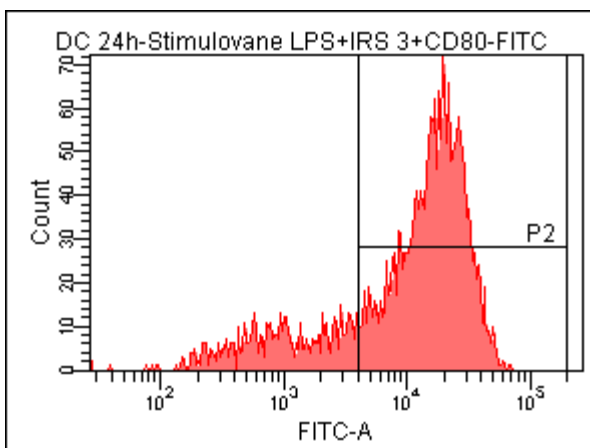
**Histogram 1.:** Nestimulované dendritické buňky značení izotypovou kontrolou k FITC.



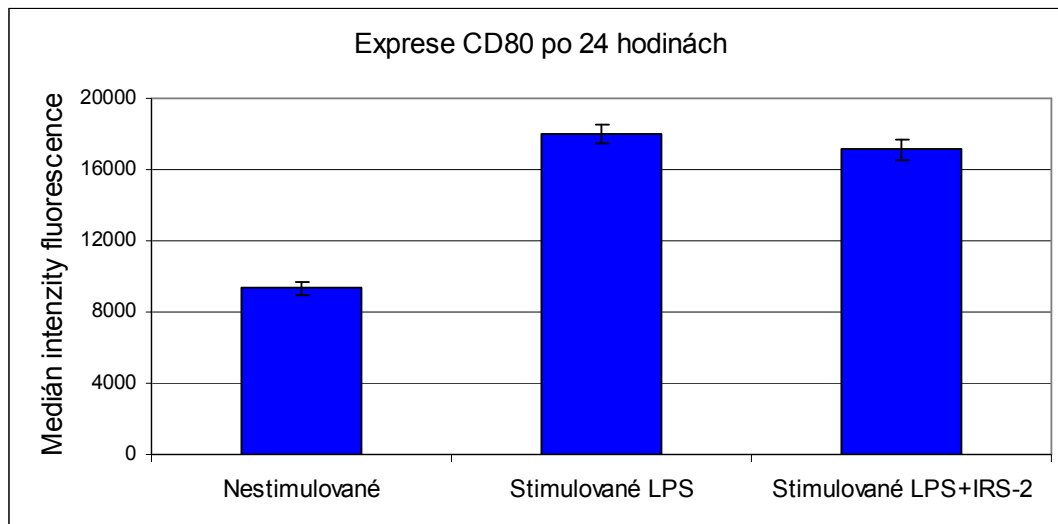
**Histogram 2.:** Expresie CD80 na nestimulovaných dendritických buňkách po 24 hodinách.



**Histogram 3.:** Expresie CD80 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS po 24 hodinách.



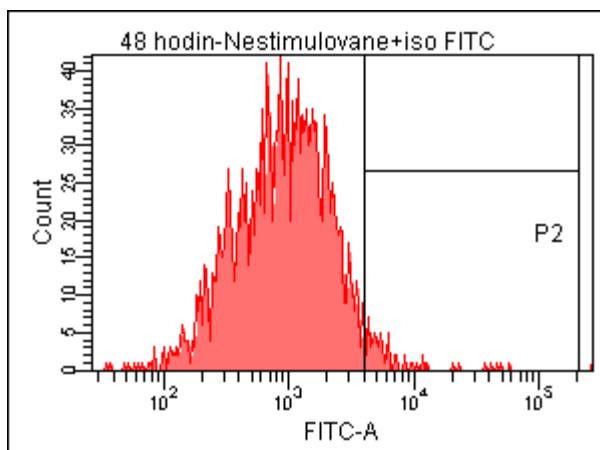
**Histogram 4.:** Expresie CD80 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS v přítomnosti IRS-2 po 24 hodinách.



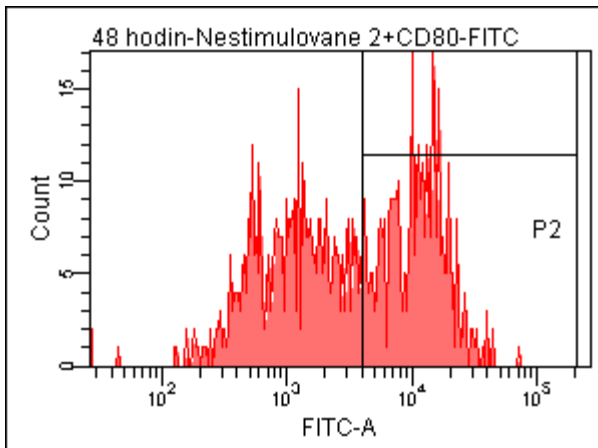
**Graf 4.:** Vliv IRS-2 na expresi CD80 na dendritických buňkách 24 hodin po stimulaci s LPS.

Po 48 hodinách aktivace buněk byla exprese CD80 snížena vlivem IRS-2 o 50% ( $p=0,034$ ), viz histogramy 5-8 a graf 5. Buňky pozitivní na zelenou fluorescenci (FITC) představuje populace P2. Graf 5 znázorňuje průměr mediánů fluorescence.

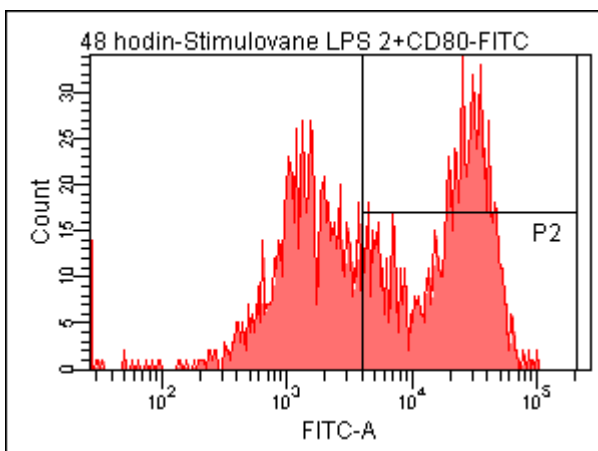
Expresce CD86 byla po 48 hodinách stimulace s LPS také zvýšena. Vlivem IRS-2 jsem zaznamenala snížení o 70% ( $p=0,034$ ), viz histogramy 9-12 a graf 6. Buňky pozitivní na žlutou fluorescenci (PE) představuje populace P6. Graf 6 znázorňuje průměr mediánů fluorescence.



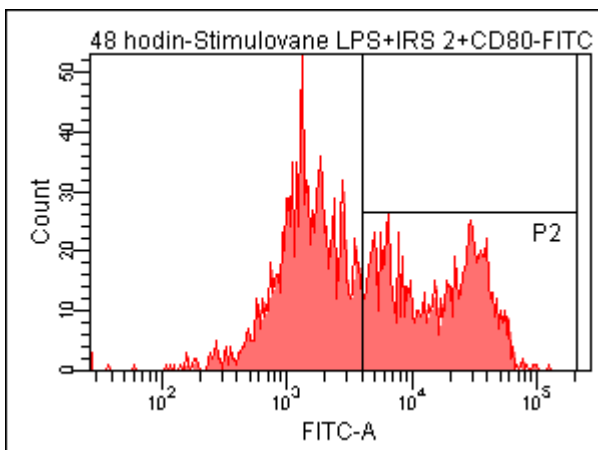
**Histogram 5.:** Nestimulované dendritické buňky značení izotypovou kontrolou k FITC.



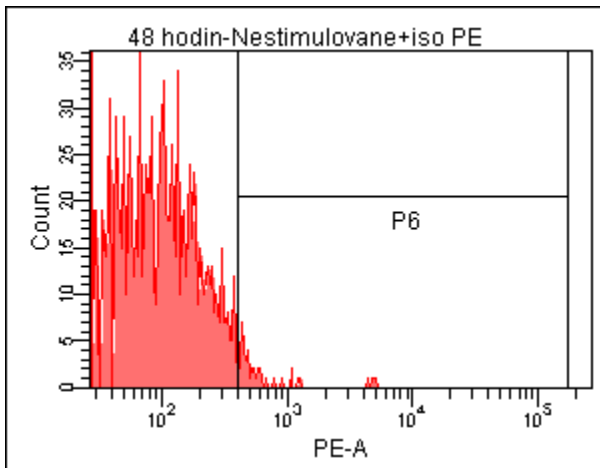
**Histogram 6.:** Expresse CD80 na nestimulovaných dendritických buňkách po 48 hodinách.



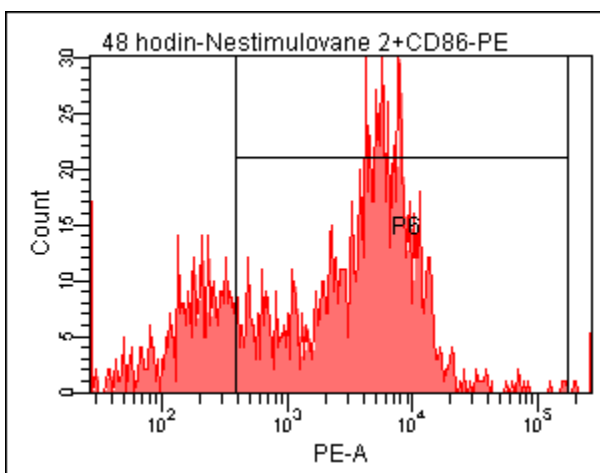
**Histogram 7.:** Expresse CD80 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS po 48 hodinách.



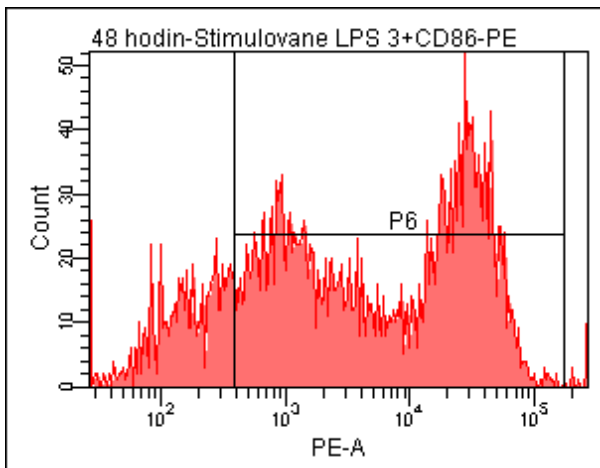
**Histogram 8.:** Expresse CD80 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS v přítomnosti IRS-2 po 48 hodinách.



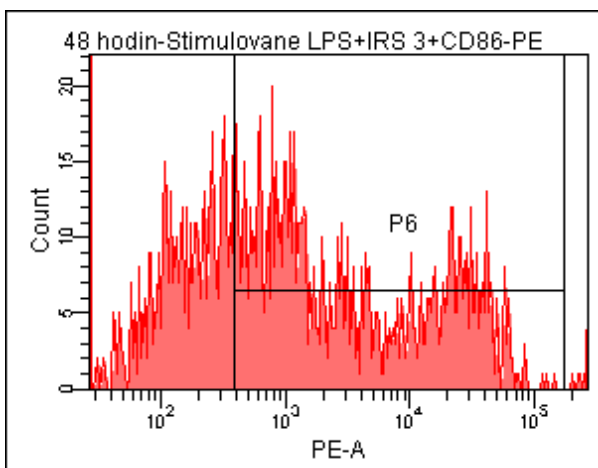
**Histogram 9.:** Nestimulované dendritické buňky značené izotypovou kontrolou k PE.



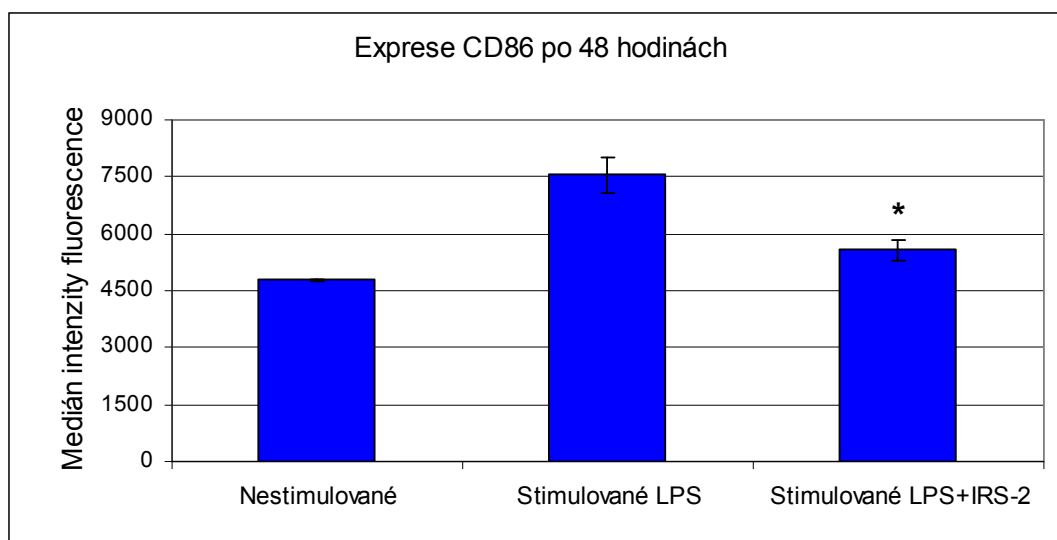
**Histogram 10.:** Expresie CD86 na nestimulovaných dendritických buňkách po 48 hodinách.



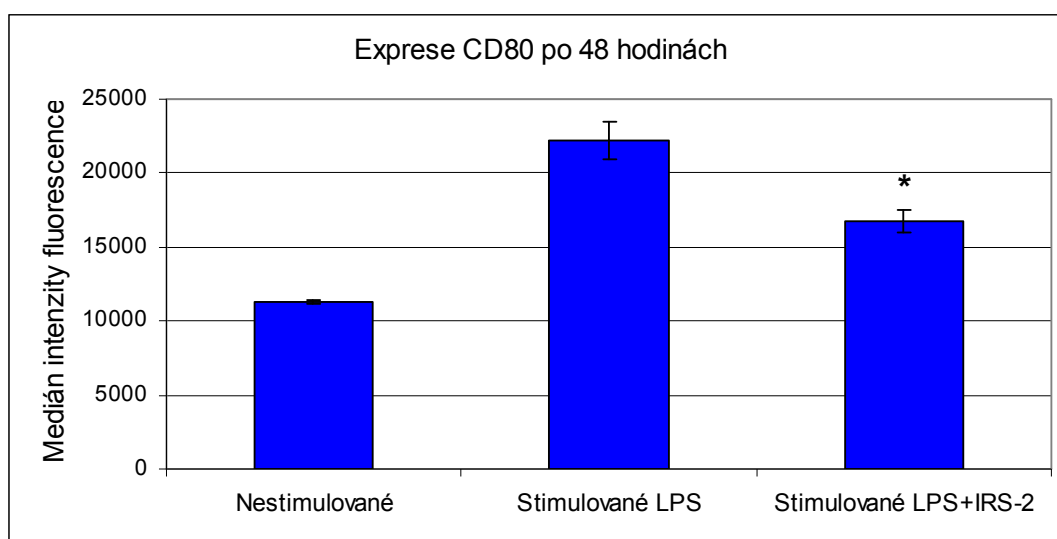
**Histogram 11.:** Expresie CD86 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS po 48 hodinách.



**Histogram 12.:** Expresie CD86 na dendritických buňkách stimulovaných s LPS v přítomnosti IRS-2 po 48 hodinách.



**Graf 5.:** Vliv IRS-2 na expresi CD80 v dendritických buňkách 48 hodin po stimulaci s LPS. \* statisticky signifikantní ( $p=0,034$ ).



**Graf 6.:** Vliv IRS-2 na expresi CD86 v dendritických buňkách 48 hodin po stimulaci s LPS. \* statisticky signifikantní ( $p=0,034$ ).



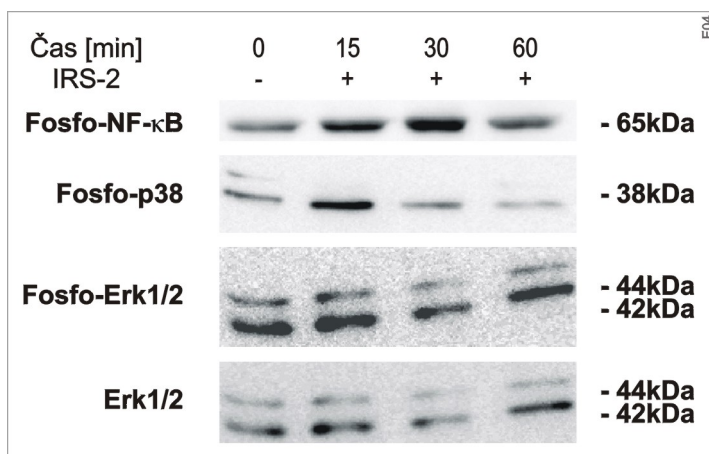
Při opakování experimentu byla sledována exprese kostimulačních molekul jen po 48h. Expresse CD80 byla snížena vlivem IRS-2 o 30% ( $p=0,218$ ) a exprese CD86 byla snížena o 12% ( $p=0,354$ ) (data nejsou prezentována). Rozdíl nedosáhl statistické významnosti.

Výsledky naznačují, že IRS-2 má inhibiční účinek na expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 na dendritických buňkách, avšak tato pozorování je nutné ještě ověřit.

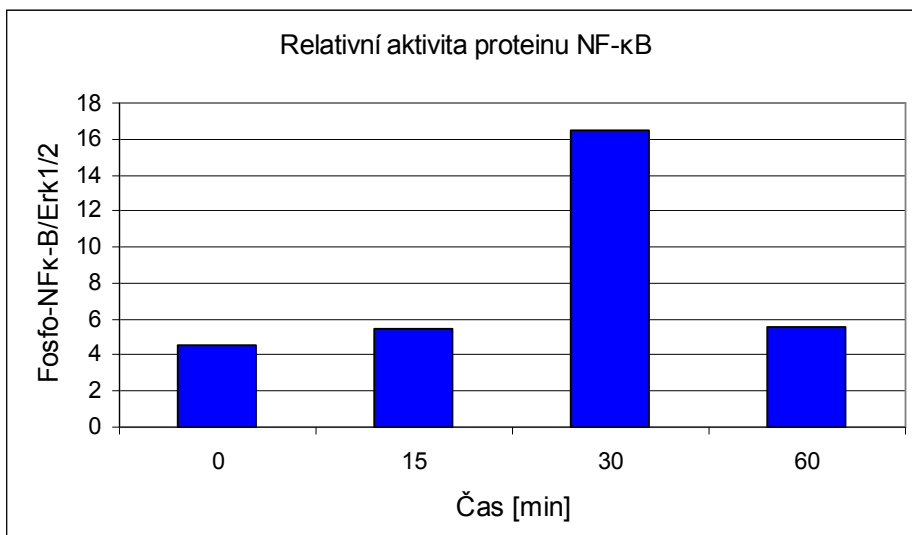
### 4.3 Vliv samotného IRS-2 na signální dráhy

Nejdříve jsem se zaměřila na vliv samotného IRS-2 na signální dráhy. Pomocí western blotu jsem zjišťovala, zda samotný IRS-2 neindukuje fosforylaci NF- $\kappa$ B nebo MAP kináz (p38 a Erk1/2).

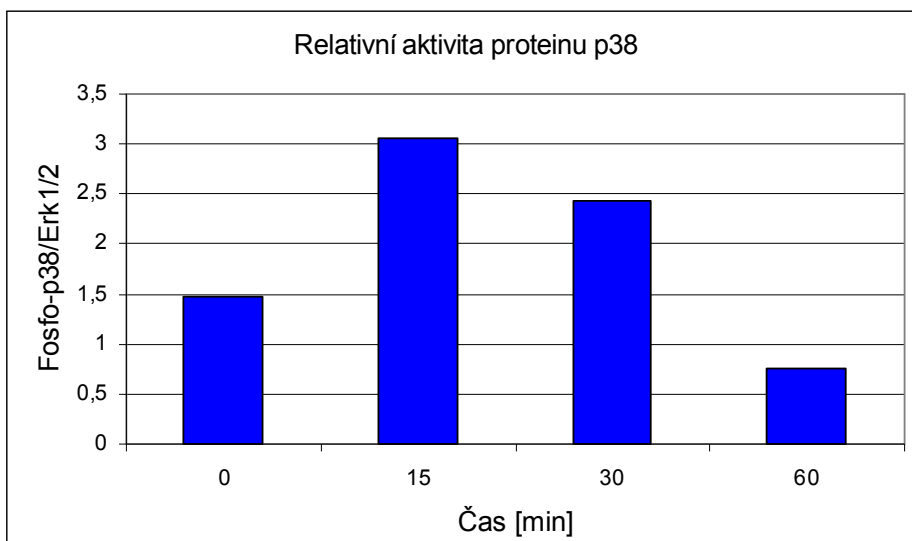
3 $\mu$ M IRS-2 jsem přidávala k dendritickým buňkám a aktivity jednotlivých kináz jsem analyzovala z proteinových extraktů v různých časových intervalech pomocí specifických protilátek rozeznávajících jen fosforylovanou formu proteinů, viz obrázek 5 a grafy 7, 8 a 9.



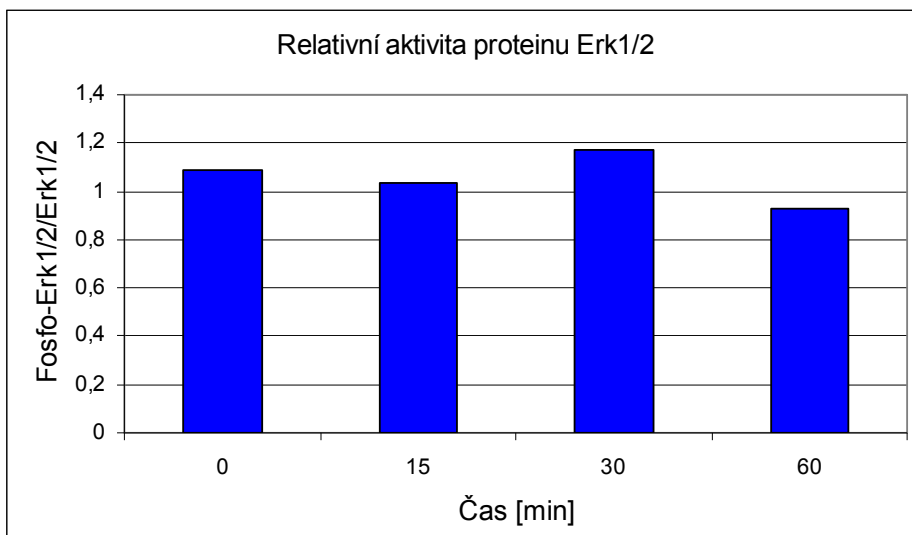
**Obrázek 5.:** Vliv IRS-2 na MAP kinázy a NF- $\kappa$ B. Dendritické buňky byly inkubovány s IRS-2 po dobu 15, 30 a 60 minut. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě NF- $\kappa$ B, p38 a Erk1/2 proteinů a proti Erk1/2 proteinu. Množství Erk1/2 proteinu slouží jako kontrola.



**Graf 7.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita NF-κB po přidání IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-NF-κB proteinu k Erk1/2 proteinu.

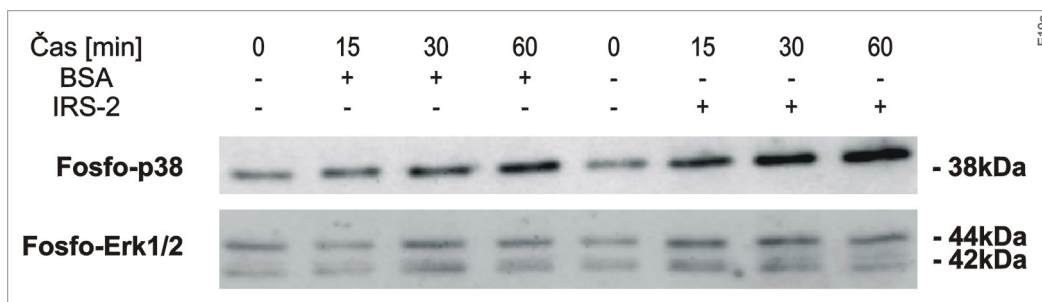


**Graf 8.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita proteinu p38 po přidání IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-p38 proteinu k Erk1/2 proteinu.

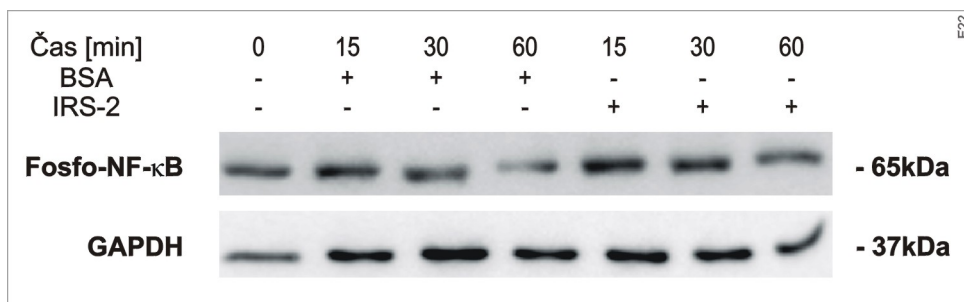


**Graf 9.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita Erk1/2 po přidání IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-Erk1/2 proteinu k Erk1/2 proteinu.

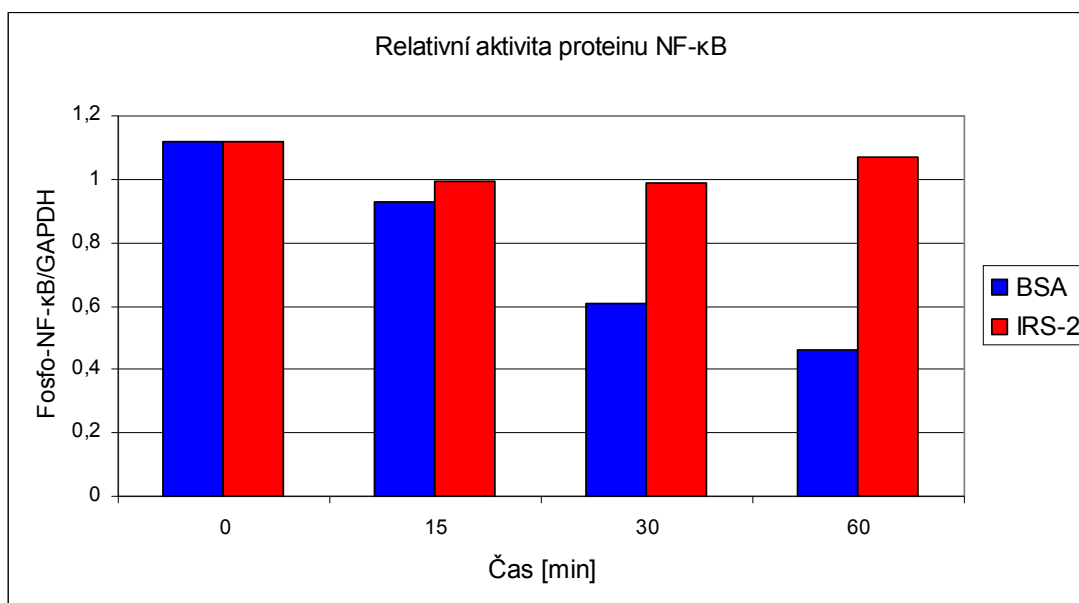
Aktivita NF- $\kappa$ B a MAP kinázy p38 se zdála být zvýšená, ale aktivita Erk1/2 byla nezměněna. Proto jsem experiment zopakovala a použila BSA (bovine serum albumin) jako kontrolu. Abych zjistila, jestli při přečištění IRS-2 od LPS nedochází ke kontaminaci nějakou látkou, která by aktivovala dendritické buňky, provedla jsem také přečištění čistého BSA (od LPS). Vliv IRS-2 na sledované kinázy byl porovnatelný s BSA (Obr. 6 a 7 a Graf 10). Po těchto experimentech jsem došla k závěru, že IRS-2 nemění aktivitu MAP kináz ani NF- $\kappa$ B.



**Obrázek 6.:** Porovnání vlivu IRS-2 a BSA na MAP kinázy. Dendritické buňky byly inkubovány s BSA nebo IRS-2 po dobu 15, 30 a 60 minut. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován western blotem za použití specifických protilátek proti fosforylované formě p38 a Erk1/2 proteinům. Do pokusu bylo založeno stejné množství buněk a při elektroforóze bylo nanášeno stejné množství proteinového extraktu, tudíž předpokládám, že všude je stejné množství proteinu.



**Obrázek 7.:** Porovnání vlivu IRS-2 a BSA na NF-κB. Dendritické buňky byly inkubovány s BSA nebo IRS-2 po dobu 15, 30 a 60 minut. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován western blotem za použití specifických protilátek proti fosforylované formě NF-κB a proti GAPDH proteinu.

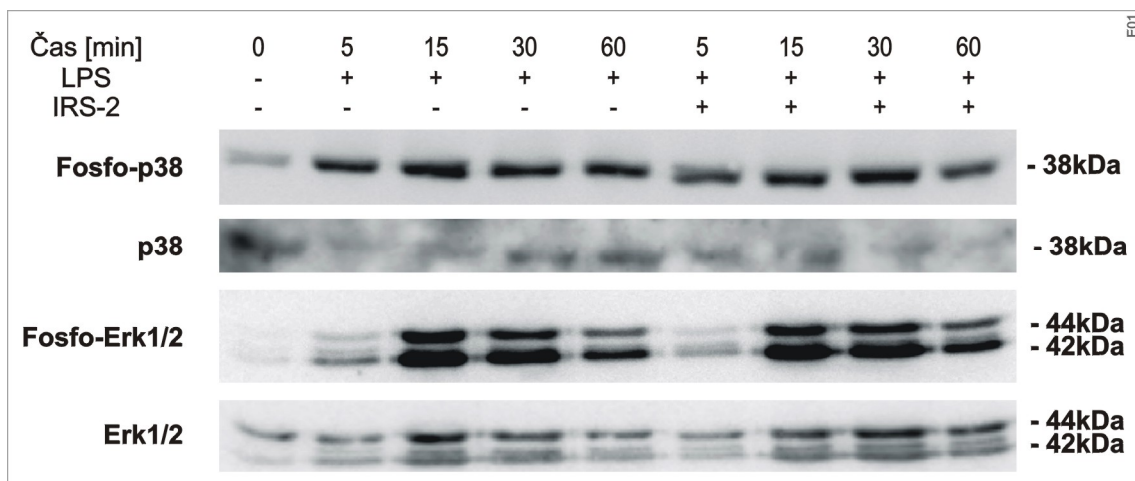


**Graf 10.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita NF-κB po přidání BSA nebo IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-NF-κB k GAPDH proteinu.

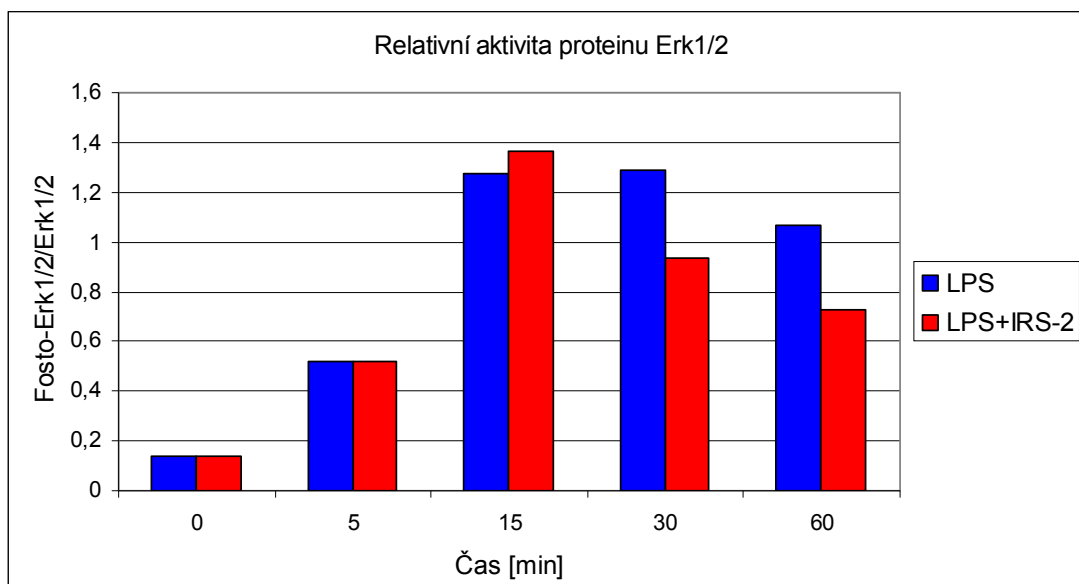
#### 4.4 Vliv IRS-2 na signální dráhy po stimulaci s LPS

S cílem objasnění účinku IRS-2 na dendritické buňky jsem se dále zabývala vlivem IRS-2 na signální dráhy aktivované s LPS. Zaměřila jsem se na MAP kinázy a NF-κB.

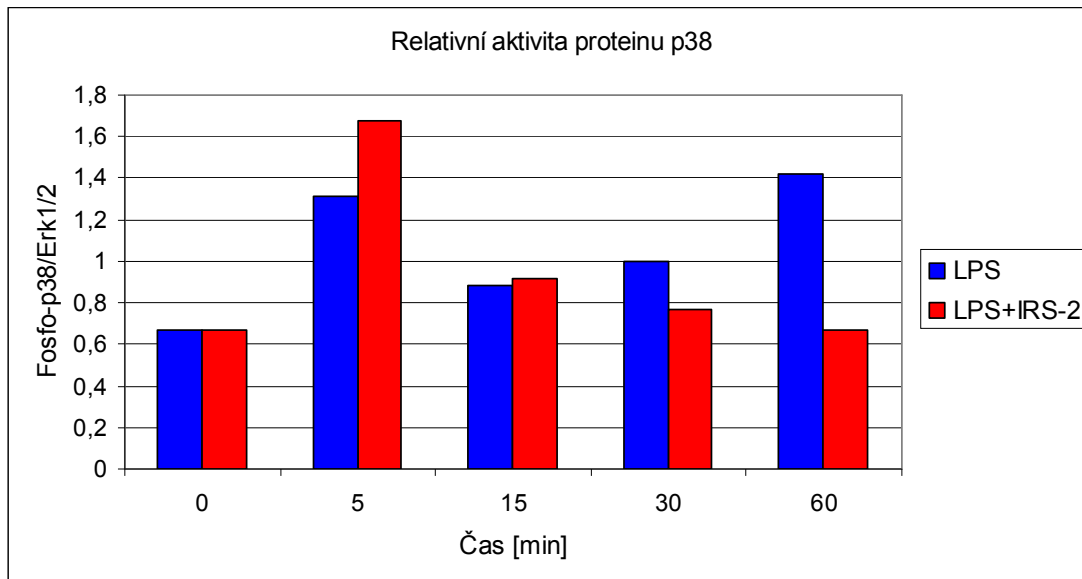
Dendritické buňky byly stimulovány s 50ng/ml LPS za přítomnosti 3μM IRS-2, který byl přidán 30 minut předem. Aktivity jednotlivých kináz byly analyzovány v různých časových intervalech pomocí specifických protilátek, které rozeznávají jen fosforylovanou formu proteinů, viz obrázek 8 a grafy 11 a 12. LPS indukoval fosforylaci obou kináz. Aktivitu Erk1/2 jsem analyzovala ještě jednou, ale ani tentokrát nebyl vliv IRS-2 patrný (data nejsou prezentována). Žádný významný rozdíl mezi aktivací testovaných MAP kináz vlivem IRS-2 však nebyl zaznamenán.



**Obrázek 8.:** Vliv IRS-2 na aktivaci MAP kinázy u dendritických buněk po stimulaci s LPS. Dendritické buňky byly stimulovány s LPS po dobu 5, 15, 30 a 60 minut. IRS-2 byl přidán 30 minut před LPS. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě p38 a Erk1/2 a proti p38 a Erk1/2 proteinům. Množství Erk1/2 proteinu slouží jako kontrola.

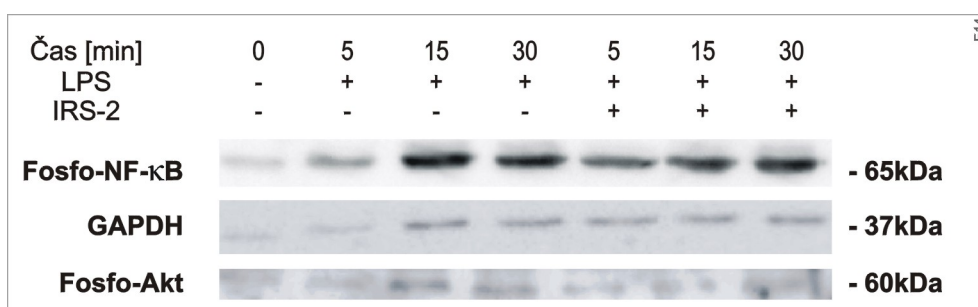


**Graf 11.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita Erk1/2 po stimulaci buněk s LPS v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-Erk1/2 proteinu k Erk1/2 proteinu.

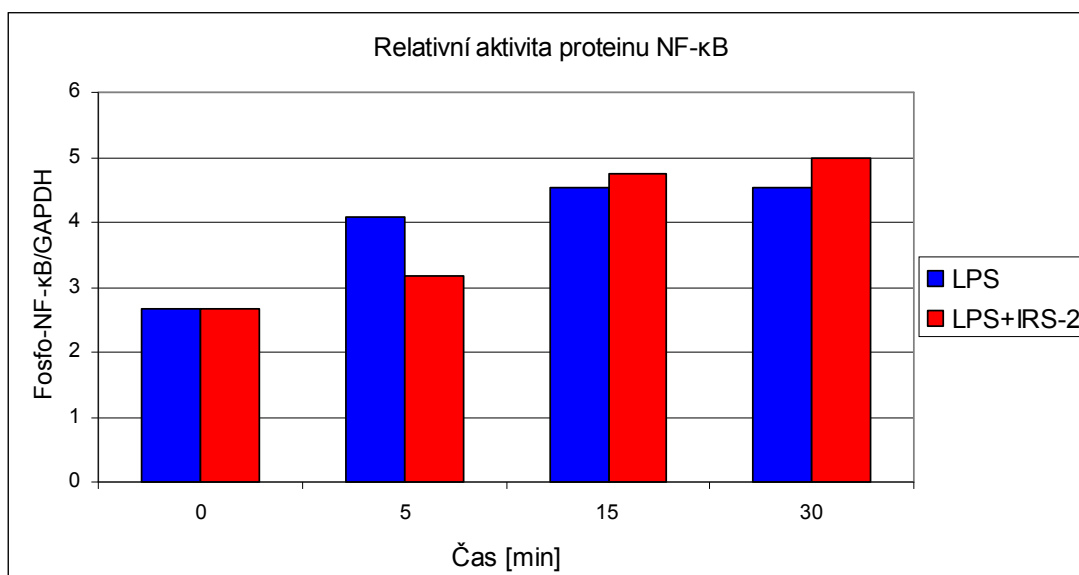


**Graf 12.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita p38 po stimulaci buněk s LPS v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-p38 proteinu k Erk1/2 proteinu.

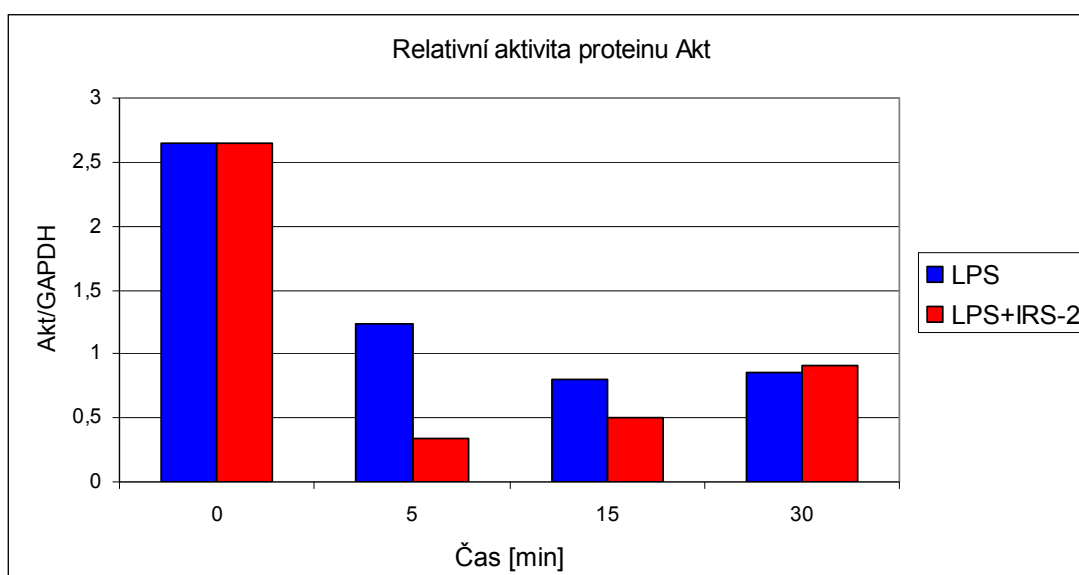
Další signální dráhy, které jsem testovala byly kaskády vedoucí k fosforylaci NF- $\kappa$ B a Akt (kináza aktivovaná PI3 kinázou). Buňky byly stimulované s LPS po dobu 5, 15 a 30 minut a byl sledován vliv IRS-2 na aktivaci kináz. Jak je patrné z obrázku 9 a grafu 13, aktivace NF- $\kappa$ B byla srovnatelná v přítomnosti IRS-2 i bez něj, opět jsem provedla opakování, kde se výsledek potvrdil (data nejsou prezentována). Fosforylace Akt se zdá být zvýšená po aktivaci buněk a mírně snižena vlivem IRS-2 (Obrázek 9 a graf 14), ale detekce proteinů se bohužel nezdařila v dobré kvalitě a tak je velmi těžké odhadnout, nakolik je tento výsledek věrohodný. Proto jsem konstatovala, že IRS-2 nemá žádný vliv na aktivaci testovaných kináz.



**Obrázek 9.:** Vliv IRS-2 na NF- $\kappa$ B a Akt po stimulaci dendritických buněk s LPS. Dendritické buňky byly stimulovány s 50 ng/ml LPS v přítomnosti 3 $\mu$ M IRS-2, které bylo přidáno 30 minut předem, po dobu 5, 15 a 30 minut. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě NF- $\kappa$ B a Akt. GAPDH protein slouží jako kontrola.

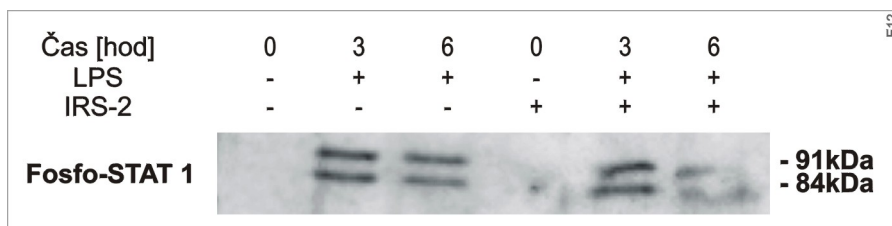


**Graf 13.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita NF-κB po stimulaci buněk s LPS v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-NF-κB proteinu k GAPDH proteinu.



**Graf 14.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita Akt po stimulaci buněk s LPS v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-Akt proteinu k GAPDH proteinu.

LPS nepřímou stimuluje v dendritických buňkách i JAK-STAT dráhu. Fosforylace STAT 1 proteinu je zprostředkována autokrinně vylučovaným IFN-β. Indukce IFN-β s LPS je závislá na TRIF signální dráze (Obr. 2). V časových intervalech 3 a 6 hodin jsem zkoumala vliv IRS-2 na aktivaci STAT 1 u buněk stimulovaných LPS, viz obrázek 10. Fosforylace STAT 1 nebyla změněná v přítomnosti IRS-2. Musela jsem konstatovat, že IRS-2 neovlivňuje TRIF závislou signální kaskádu.

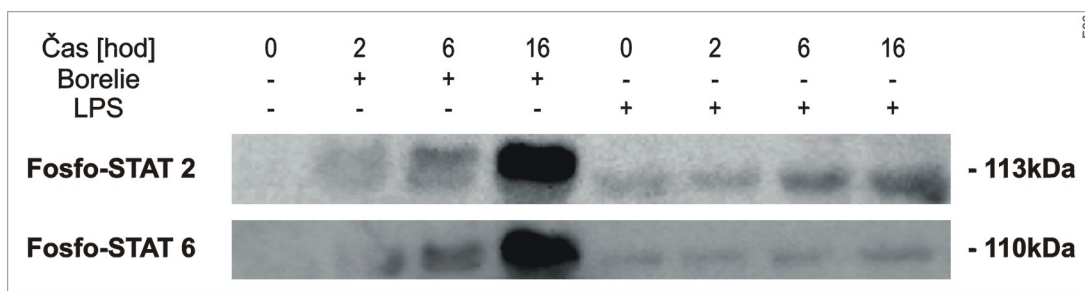


**Obrázek 10.:** Vliv IRS-2 na JAK-STAT dráhu buněk stimulovaných s LPS. Dendritické buňky byly stimulovány s 50ng/ml LPS v přítomnosti 3 $\mu$ M IRS-2, po dobu 3 a 6 hodin. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě STAT 1 proteinu. Do pokusu bylo založeno stejné množství buněk a při elektroforéze bylo naneseno stejné množství proteinového extraktu, tudíž předpokládám, že všude je stejné množství proteinu.

#### 4.5 Vliv IRS-2 na JAK-STAT dráhu po stimulaci s LPS nebo boreliemi v dendritických buňkách

Jak již bylo zmíněno v úvodu, aktivita STAT proteinů je kontrolována proteolyticky serinovými proteázami. Navíc produkci TNF- $\alpha$  a IL-6 v dendritických buňkách stimulovaných s boreliemi negativně ovlivnil IRS-2 (Bc. Jana Páleníková, osobní sdělení). Proto jsem se rozhodla testovat aktivaci JAK-STAT signálních drah. Specifickými protilátkami jsem se snažila detekovat STAT proteiny a sledovat vliv IRS-2 na jejich aktivaci nebo množství.

Nejdříve jsem porovnávala aktivaci STAT proteinů v dendritických buňkách po stimulaci s LPS a boreliemi. Dendritické buňky byly aktivovány po dobu 2, 6 a 16 hodin s 50ng/ml LPS nebo s boreliemi (10 spirochet na 1 buňku). Fosforylace STAT 2 a STAT 6 byla detekována western blotem. Ukázalo se, že borelie aktivují testované STATy mnohem více než LPS (Obr. 11), proto jsem v dalších pokusech používala jen borelie. Též jsem si vybrala jen dva časové intervaly k testování vlivu IRS-2 na STAT proteiny.

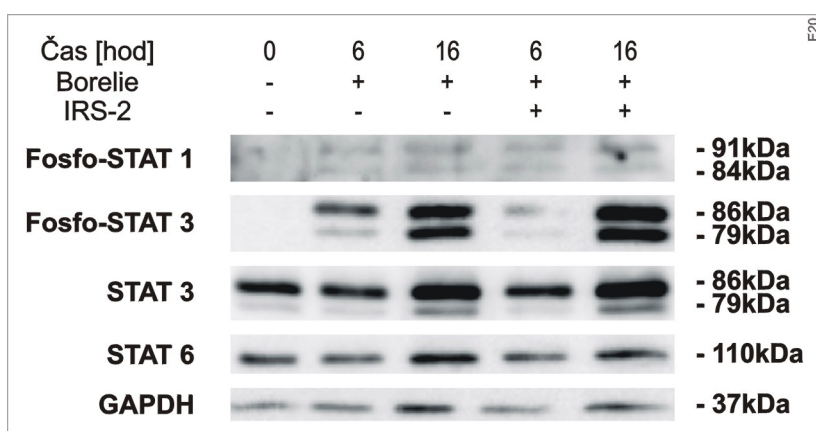


**Obrázek 11.:** Fosforylace STAT 2 a STAT 6 v buňkách stimulovaných s LPS nebo boreliemi. Dendritické buňky byly stimulovány s LPS a boreliemi, po dobu 2, 6 a 16 hodin. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě STAT 2 a STAT 6 proteinu. Do pokusu bylo založeno stejné množství buněk a při elektroforéze bylo naneseno stejné množství proteinového extraktu, tudíž předpokládám, že všude je stejné množství proteinu.

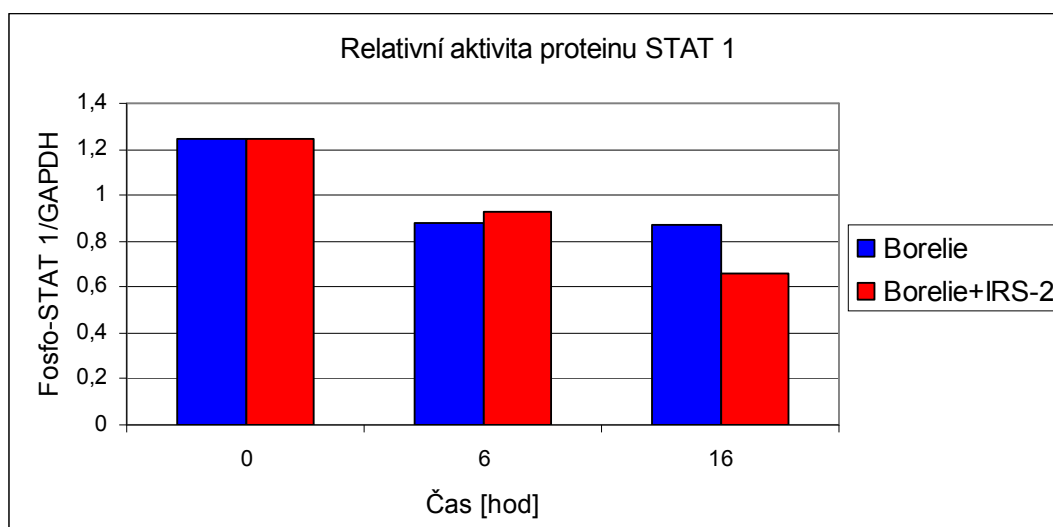
Vliv IRS-2 na STAT 1, STAT 3 a STAT 6 proteiny byl testován na buňkách stimulovaných s boreliemi po 6 a 16 hodinách, viz obrázek 12 a grafy 15, 16, 17 a 18.



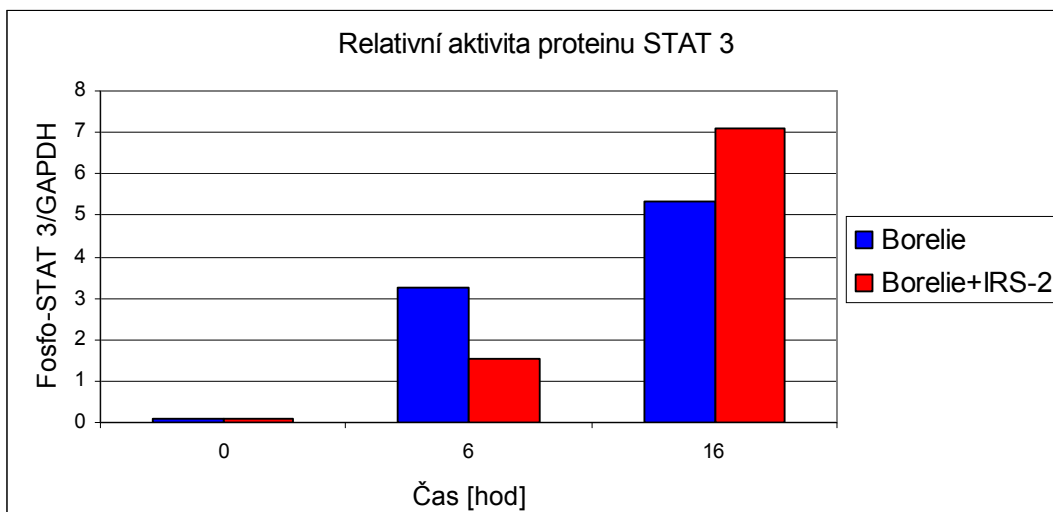
Fosforylace STAT 1 se zdá být jen málo zvýšená po aktivaci buněk a vliv IRS-2 není patrný. Signál byl natolik slabý, že je těžké odhadnout, nakolik je výsledek v grafu 15 (densitometrické vyhodnocení STAT 1 fosforylace) věrohodný. Fosforylace STAT 3 proteinu byla jasně indukována. Po šesti hodinách byla aktivita STAT 3 snížena v přítomnosti IRS-2. Po 16 hodinách už rozdíl v aktivitě STAT 3 patrný nebyl. IRS-2 neovlivnil množství STAT 3 proteinu. V případě STAT 6 proteinu se sice nepodařilo detekovat jeho fosforylovanou formu, ale z porovnání celkového STAT 6 proteinu v kontrolních vzorcích a vzorcích s IRS-2 se dá usoudit, že IRS-2 neovlivňuje množství STAT 6 proteinu.



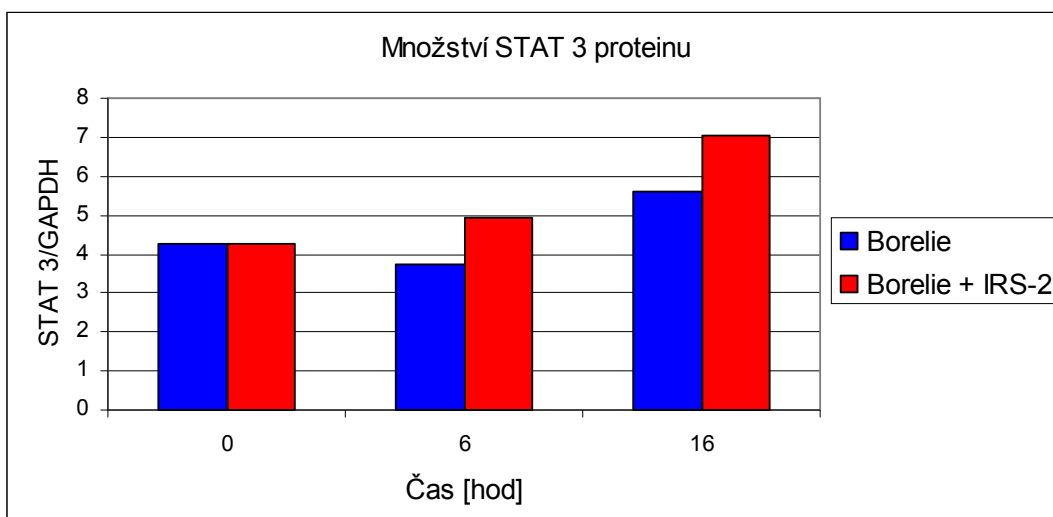
**Obrázek 12.:** Vliv IRS-2 na buňky stimulované boreliemi. Dendritické buňky byly stimulovány s boreliemi v přítomnosti IRS-2, po dobu 6 a 16 hodin. Následně byly buňky lyzovány a proteinový extrakt byl analyzován pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti fosforylované formě STAT 1 a STAT 3 proteinu. Membránu se STAT 1 a STAT 3 fosforylovanými proteiny jsem podrobila odstraňování protilátek pomocí striping pufru a posléze opět analyzovala pomocí western blotu za použití specifických protilátek proti STAT 3 a STAT 6 proteinům.



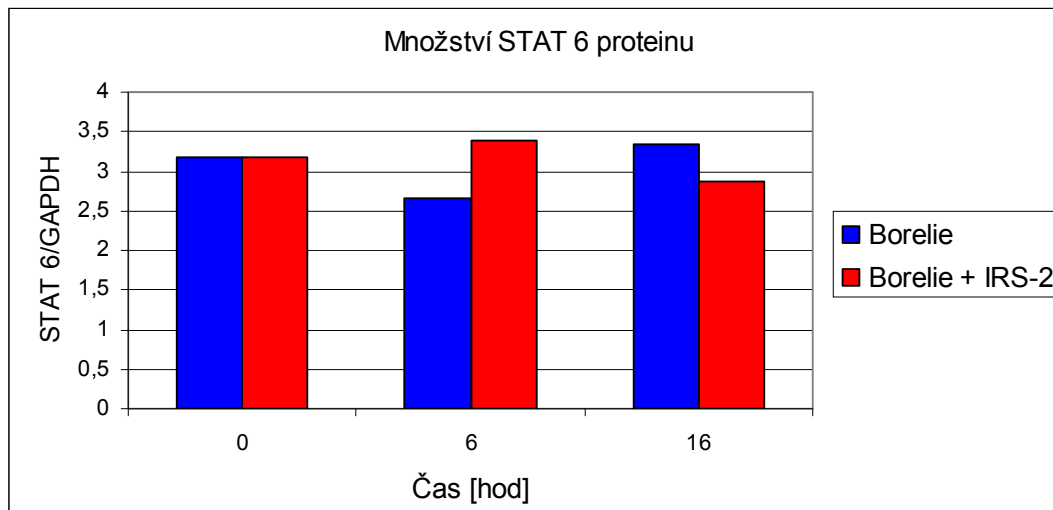
**Graf 15.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita STAT 1 proteinu po stimulaci buněk s boreliemi v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-STAT 1 proteinu k GAPDH proteinu.



**Graf 16.:** V grafu je znázorněna relativní aktivita STAT 3 proteinu po stimulaci buněk s boreliemi v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů fosfo-STAT 3 proteinu k GAPDH proteinu.



**Graf 17.:** V grafu je znázorněno množství STAT 3 proteinu po stimulaci buněk s boreliemi v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů STAT 3 proteinu k GAPDH proteinu.



**Graf 18.:** V grafu je znázorněno množství STAT 6 proteinu po stimulaci buněk s boreliemi v přítomnosti IRS-2. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr densitometrických odečtů STAT 6 proteinu k GAPDH proteinu.

## 5. Diskuse

Dendritické buňky mají nenahraditelnou roli při spouštění specifické imunitní odpovědi. Klíšťata naopak potřebují, aby k imunitní odpovědi hostitele nedošlo, protože na něm potřebují sát po několik dní a imunitní reakce hostitele by mohla negativně ovlivnit úspěšnost sání a tím i jejich vitalitu. Proto klíště ve slinách produkuje mnoho složek, které ovlivňují imunitní odpověď hostitele. Tím ovšem usnadňují proniknutí dalších patogenních organismů do těla hostitele. Vzhledem k tomu, že i člověk se nezdědká stává hostitelem klíštěte, je tento přenos patogenů nežádoucí. Proto se mnohé studie zaměřují na zkoumání vlivu klíštěcích slin na imunitní odpověď hostitele. Navíc by některé imunosupresivní účinky klíštěcích slin mohly pomoci při zmírnění některých lidských onemocnění. I další studie se zaměřují na charakterizaci jednotlivých složek klíštěcích slin, ale složek je mnoho a není lehké je detailně charakterizovat.

Chmelař a spol. (2011) se zaměřili na IRS-2, protein získaný ze slin *Ixodes ricinus*, který izolovali a poté vytvořili konstrukt pro produkci rekombinantního proteinu v *Escherichia coli*. Bylo prokázáno, že IRS-2 inhibuje otok a příliv neutrofilů do zanícené tkáně. Protein IRS-2 také inhibuje cathepsin G a chymázu, které patří mezi prozánětlivé serinové proteázy.

Účinky IRS-2 na dendritické buňky nebyly zatím popsány, proto jsem se v této práci zabývala vlivem IRS-2 na produkci cytokinů, expresi kostimulačních molekul a signální dráhy po aktivaci dendritických buněk LPS nebo boreliemi.

Sliny klíšťat snižují schopnost dendritických buněk migrovat do lymfatických uzlin a tam aktivovat naivní T-lymfocyty. Klíštěcí sliny také snižují expresi MHC II na dendritických buňkách, čímž snižují jejich schopnost prezentovat antigen (Skalová, 2008). Dendritické buňky v přítomnosti klíštěcích slin produkují menší množství INF- $\beta$  a IL-12p70. Sliny klíšťat mají také vliv na aktivaci signálních drah v dendritických buňkách, kde snižují fosforylaci Akt a Erk1/2 (Lieskovská, 2011; Lieskovská, nepublikováno).

Na základě výše jmenovaných faktů jsem předpokládala, že by IRS-2 mohl mít vliv na dendritické buňky, což jsem se v této práci snažila zjistit. Mé výsledky naznačují, že IRS-2 nemá prokazatelný vliv na produkci TNF- $\alpha$ , IL-12 ani IL-10 dendritickými buňkami stimulovanými s LPS.

Naopak Iris, který je stejně jako IRS-2 klíštěcí serpin z *I. ricinus*, výrazně zvyšuje produkci IL-10 mononukleárními buňkami z periferní krve aktivovanými LPS a inhibuje produkci TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-8 (Leboulle, 2002). Zajímavé je, že jeho inhibiční schopnost

nezávisí na jeho inhibiční aktivitě vůči serinovým proteázám, ale je zprostředkována takzvanými exosites (Prevot, 2009).

Na druhé straně výsledky Bc. Jany Páleníkové naznačují, že IRS-2 negativně ovlivňuje produkci cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-6 dendritickými buňkami stimulovanými s boreliemi, které na rozdíl od LPS aktivují několik TLR.

Také přes proteázami aktivované receptory (PAR) může docházet k indukci některých cytokinů, jako jsou IL-10 a IL-12 lidskými dendritickými buňkami (Shpacovitch, 2008).

Bylo publikováno, že poškození chymotrypsin-like peptidázové aktivity vede ke snížené produkci IL-12 (Naujokat, 2007). I když IRS-2 inhibuje chymotrypsin-like proteázy, inhibiční vliv na IL-12 jsem v myších dendritických buňkách nezaznamenala.

Poškození chymotrypsin-like peptidázové aktivity má také za následek snížení exprese některých povrchových molekul lidskými dendritickými buňkami, mezi které patří i CD80 a CD86 (Naujokat, 2007). V mých pokusech jsem při zjišťování vlivu IRS-2 na expresi kostimulačních molekul po 24 hodinách nezaznamenala žádný vliv IRS-2 na buňky stimulované s LPS, ale po 48 hodinách výsledky naznačují, že IRS-2 může mít inhibiční účinek na expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 na dendritických buňkách. Výsledky však nebyly jednoznačné, proto je nutné tento závěr ještě ověřit. Snížené množství kostimulačních molekul na povrchu buňky může mít za následek snížení schopnosti aktivovat T-lymfocyty. Proto by, i na základě výsledků Naujokata (2007), bylo zajímavé otestovat zda je schopnost prezentovat antigen naivním T-lymfocytům ovlivněna IRS-2.

Vliv IRS-2 na signální dráhy jsem zkoumala na MAP kinázách (p38 a Erk1/2), proteinu NF- $\kappa$ B a proteinu Akt (downstream cíl PI3 kinázy). Po aktivaci dendritických buněk s LPS docházelo ke zvýšené fosforylaci všech zmíněných proteinů. IRS-2 neovlivnil aktivitu p38, Erk1/2 ani NF- $\kappa$ B. Fosforylace Akt byla pouze slabě zvýšená po stimulaci s LPS, ale zdá se, že v přítomnosti IRS-2 byla inhibována. Signál byl však slabý, takže je těžké odhadnout, nakolik je výsledek, svědčící pro pokles v Akt aktivitě (v grafu 15), věrohodný.

Protein NF- $\kappa$ B je potřeba k maturaci dendritických buněk. Inhibitory chymotrypsin-like peptidázové aktivity snižují po stimulaci dendritických buněk s LPS množství NF- $\kappa$ B lokalizovaného v jádře, zatímco jeho množství v cytoplazmě zůstává nezměněno (Naujokat, 2007). Já jsem u všech testovaných proteinů detekovala množství proteinů v celé buňce. Proto jsem nemohla zjistit změnu množství NF- $\kappa$ B v jádře a tím pádem nemohu vyloučit inhibiční vliv IRS-2 na NF- $\kappa$ B v jádře.

V dalších pokusech jsem se zaměřila na JAK-STAT signální dráhu. JAK-STAT dráha v dendritických buňkách byla aktivována jak LPS tak boreliemi. Borelie indukovaly fosforylaci STATů silněji než LPS, a proto jsem se na JAK-STAT signální dráhu zaměřila pouze po stimulaci buněk s boreliemi. Borelie indukují fosforylaci STAT 1, STAT 3 a STAT 6 (Behera, 2004, Lieskovská, 2012). Fosforylovanou formu STAT 1 se nezdařilo v boreliemi stimulovaných buňkách zaznamenat. U STAT 3 bylo jasné, že borelie indukují jeho fosforylaci. Po šesti hodinách byla aktivita STAT 3 snížena v přítomnosti IRS-2. Po 16 hodinách už rozdíl v aktivitě STAT 3 patrný nebyl. Vzhledem k tomu, že STAT 3 je silně aktivován právě cytokinem IL-6 (Cheon, 2011) a IRS-2 snižuje jeho produkci (Bc. Jana Páleníková, osobní sdělení), snížení STAT 3 fosforylace po stimulaci s boreliemi může být důsledkem snížené produkce IL-6.

IRS-2 může také potenciálně inhibovat proteolýzu STATů. Některé STATy (STAT 1, STAT 5 a STAT 6) jsou štěpeny specifickými serinovými proteázami. Tyto proteázy nerozlišují mezi fosforylovaným a nefosforylovaným STATem a jejich proteolytickým štěpením vznikají neúčinné STATy (Hendry, 2004).

Z mých výsledků se dá usoudit, že pokud IRS-2 nemá vliv na množství STAT 6 proteinu, potenciální serinové proteázy, které působí specificky na STAT 6 protein, nejsou inhibovány IRS-2.

Na základě mých výsledků a všech dalších zjištění bych se domnívala, že by bylo vhodné otestovat vliv IRS-2 také na efektorové buňky a hledat další signální dráhy, které by mohly být ovlivněny serinovými proteázami a jejich inhibitory.

## 6. Závěr

1. Vliv IRS-2 na produkci testovaných cytokinů ( TNF- $\alpha$ , IL-12 a IL-10) dendritickými buňkami aktivovanými LPS nebyl zaznamenán.
2. Exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 v dendritických buňkách aktivovaných LPS byla negativně ovlivněna IRS-2 po 48 hodinách, ale snížení jejich exprese je nutné ještě ověřit.
3. Vliv IRS-2 na aktivitu p38, Erk1/2 ani NF- $\kappa$ B v buňkách stimulovaných LPS nebyl pozorován. Účinek IRS-2 na fosforylaci Akt nebyl jednoznačný.
4. IRS-2 negativně ovlivnil fosforylaci transkripčního faktoru STAT 3 šest hodin po přidání *B. afzelii* k dendritickým buňkám. IRS-2 neovlivnil množství STAT 6 proteinu, z toho usuzuji, že potenciální serinové proteázy, které působí specificky na STAT 6 protein nejsou inhibovány IRS-2.

## 7. Seznam použitých zkratk

Akt – serin/threoninová kináza

APC – allophycocyanin

ATP – adenosin trifosfát

BOFES – fetal bovine serum gold

CD – cluster of differentiation – molekuly na povrchu buněk

dH<sub>2</sub>O – destilovaná voda

dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay

Erk1/2 – extracellular signal-regulated kinase

FITC – fluorescein isothiocyanate

GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, jde o housekeeping gen, který je exprimován neustále a ve stejném množství v jednotlivých tkáních

IFN – interferon

IKK – IκB kináza

IL – interleukin

IRAK – IL-1 receptor-associated kinase

Iris – *Ixodes ricinus* immunosuppressor

IRS-2 – *Ixodes ricinus* serpin 2

JAK – Janus kinase

LPS – lipopolysacharid

MAP – mitogen activated protein

MHC – major histocompatibility complex – hlavní histokompatibilní komplex

mRNA – messenger ribonukleová kyselina

MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88

NF-κB – nuclear factor κB

NK buňky – natural killer buňky

NOD-like receptory – nucleotide oligomerization domain receptors

PAR – proteázami aktivované receptory

PBS – phosphate buffered saline

PE – phycoerythrin

PI3 kináza – phosphatidylinositol 3 kináza

PIP2 – phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate



PIP3 – phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate  
PIAS – protein inhibitor of activated STATs  
Ser – serin  
Serpín – inhibitor serinových proteáz  
SOCS – suppressors of cytokine signalling  
ssRNA – jednovláknová ribonukleová kyselina  
STAT – signal transducer and activator of transcription  
TAK1 – TGF- $\beta$ -activated kinase 1  
TBS – Tris buffered saline  
TBST - Tris buffered saline + 1% Tween 20  
Thr - threonin  
TIR – Toll/IL-1 receptor  
TLR – Toll-like receptory  
TNF – tumor necrosis factor  
TRIF – TIR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$   
Tyr - tyrosin

## 8. Použitá literatura

**Aaronson DS, Horvath CM.** 2002: A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 296(5573):1653-5.

**Aida Y, Pabst MJ.** 1990: Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods*. Sep 14;132(2):191-5.

**Baselga J.** 2011: Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *The Oncologist*.;16 Suppl 1:12-9.

**Behera AK, Thorpe CM, Kidder JM, Smith W, Hildebrand E, Hu LT.** 2004: *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases from human chondrocytes requires mitogen-activated protein kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathways. *Infection and Immunity*. May;72(5):2864-71.

**Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Shevach E.M, Strober W.** 1992: Current protocols in immunology. National Institutions of Health, Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience

**Dai R, Phillips RA, Karpuzoglu E, Khan D, Ahmed SA.** 2009: Estrogen regulates transcription factors STAT-1 and NF-kappaB to promote inducible nitric oxide synthase and inflammatory responses. *Journal of Immunology*. Dec 1;183(11):6998-7005.

**Epling-Burnette PK, Garcia R, Bai F, Ismail S, Loughran TP Jr, Djeu JY, Jove R, Wei S.** 2002: Carboxy-terminal truncated STAT5 is induced by interleukin-2 and GM-CSF in human neutrophils. *Cellular Immunology*. May-Jun;217(1-2):1-11.

**Ertel SH, Nelson RS, Cartter ML.** 2012: Effect of surveillance method on reported characteristics of Lyme disease, Connecticut, 1996-2007. *Emerging Infectious Diseases*. Feb;18(2):242-7.

**Ferenčík M., Rovenský J., Mat'ha V.** 2000: Dictionary of immunology. Slovak Academic Press, s.r.o.,

**Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM.** 2009: The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*. Jan 1;14:2051-88.

**Goodman J.L., David Tappen Dennis, Sonenshine D.E.** 2005: Tick-borne diseases of humans. ASM Press (American Society for Microbiology)

**Hendry L, John S.** 2004: Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *European Journal of Biochemistry*. Dec;271(23-24):4613-20.

**Hořejší V., Bartůňková J.** 2005: Základy imunologie. Triton, 3. vydání,

**Hovius JW, van Dam AP, Fikrig E.** 2007: Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology*. Sep;23(9):434-8.

**Hovius JW, Levi M, Fikrig E.** 2008: Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Medicine*. Feb;5(2):e43.

**Hovius JW.** 2009: Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *The Journal of Investigative Dermatology*. Oct;129(10):2337-9.

**Cheon H, Yang J, Stark GR.** 2011: The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. Jan;31(1):33-40.

**Chmelar J, Oliveira CJ, Rezacova P, Francischetti IM, Kovarova Z, Pejler G, Kopacek P, Ribeiro JM, Mares M, Kopecky J, Kotsyfakis M.** 2011: A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. Jan 13;117(2):736-44.

**Ihle JN, Kerr IM.** 1995: Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics*. Feb;11(2):69-74.

**Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FW, Shimoda K.** 1997: Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*.;15 Suppl 1:105-11; discussion 112.

**Kopecký J, Kuthejlová M.** 1998: Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology*. Apr;20(4):169-74.

**Leboulle G, Crippa M, Decrem Y, Mejri N, Brossard M, Bollen A, Godfroid E.** 2002: Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *The Journal of Biological Chemistry*. Mar 22;277(12):10083-9.

**Lieskovská J, Kopecký J.** 2012: Tick saliva suppresses IFN signalling in dendritic cells upon *Borrelia afzelii* infection. *Parasite Immunology*. Jan;34(1):32-9. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01345.x.

**Lieskovská J., Kopecký J.** Nепublikováno: Tick saliva attenuates NF- $\kappa$ B, Erk1/2, and Akt mediated pathways in response to TLR-2 ligand and *Borrelia afzelii* in dendritic cells.

**Lipscomb MF, Masten BJ.** 2002: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological Reviews*. Jan;82(1):97-130.

**Magnuson HJ, Eagle H, Fleischman R.** 1948: The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication in vivo. *American Journal of Syphilis Gonorrhoea and Venereal Diseases*. Jan;32(1):1-18.

**Murray PJ.** 2007: The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of Immunology*. Mar 1;178(5):2623-9.

**Naujokat C, Berges C, Höh A, Wieczorek H, Fuchs D, Ovens J, Miltz M, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V.** 2007: Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. Jan;120(1):120-32.

**Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, Mordue D, Schwartz I.** 2009: Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *Journal of Immunology*. Oct 15;183(8):5279-92.

**Prevot PP, Adam B, Boudjeltia KZ, Brossard M, Lins L, Cauchie P, Brasseur R, Vanhaeverbeek M, Vanhamme L, Godfroid E.** 2006: Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The Journal of Biological Chemistry*. Sep 8;281(36):26361-9.

**Prevot PP, Beschin A, Lins L, Beaufays J, Grosjean A, Bruys L, Adam B, Brossard M, Brasseur R, Zouaoui Boudjeltia K, Vanhamme L, Godfroid E.** 2009: Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS Journal*. Jun;276(12):3235-46.

**Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc H G, Neteler M, Rosa R.** 2011: Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill*. Jul 7;16(27). pii: 19906.

**Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A.** 1971: Parasitic diseases of wild mammals. Iowa State University Press, 2001 (second edition)

**Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M.** 2008: Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. Jun;83(6):1309-22.

**Skallová A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J.** 2008: Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *Journal of Immunology*. May 1;180(9):6186-92.

**Slámová M, Skallová A, Páleníková J, Kopecký J.** 2011: Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite Immunology*. Dec;33(12):654-60.

**Stetson DB, Medzhitov R.** 2006: Type I interferons in host defense. *Immunity*. Sep;25(3):373-81.

**Takeda Kiyoshi, Akira Shizuo** 2004: TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16 (2004) 3–9

**Takeda Kiyoshi and Akira Shizuo** 2005: Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, Vol. 17, No. 1, pp. 1–14

**van Vliet SJ, den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** 2007: Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Current Opinion in Immunology*. Aug;19(4):435-40. Epub 2007 Jul 12.

**Watts C, West MA, Zaru R.** 2010: TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. Feb;22(1):124-30.