

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Úloha inhibičních receptorů PD-1 a PD-L1 při
infekci *Borrelia burgdorferi* u myši**

Diplomová práce

Bc. Anna Palouňková

Školitel: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

České Budějovice 2024

Palounková A., 2024: Úloha inhibičních receptorů PD-1 a PD-L1 při infekci *Borrelia burgdorferi* u myši. [The role of PD-1 and PD-L1 inhibitory receptors during *Borrelia burgdorferi* infection in mice. Mgr. Thesis, in Czech.] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Borrelia burgdorferi, the causative agent of Lyme disease, induces upregulation of inhibitory immune checkpoint PD-L1 in mice. We studied the role of PD-1/PD-L1 axis during *Borrelia* infection *in vitro* and evaluated the effects of neutralizing anti-PD-L1 antibody on infected laboratory mice *in vivo* and *ex vivo* with a particular focus on the phenotypization and proliferation of T lymphocytes in response to *B. burgdorferi* infection. Additionally, we investigated the dissemination of *Borrelia* into target tissues under anti-PD-L1 treatment.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2024

.....

Anna Palounková

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, veškerou poskytnutou pomoc, trpělivost a ochotu pomoci s jakýmkoliv problémem, ať už během práce v laboratoři či při zpracování této práce.

Dále chci poděkovat celé své rodině a nejbližším, kteří mi byli oporou jak při psaní práce, tak i v průběhu celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Rod <i>Borrelia</i>	1
1.2	Klinika lymeské boreliózy	1
1.3	Imunitní odpověď při infekci bakteriemi rodu <i>Borrelia</i>	3
1.4	Únikové mechanismy imunitního systému.....	4
1.5	Inhibiční kontrolní body imunitního systému	6
1.5.1	Mechanismus působení kontrolních bodů CTLA-4 a PD-1.....	7
1.5.2	Inhibiční dráha PD-1/PD-L1	7
1.5.3	Imunitní kontrolní body u nádorových onemocnění	8
1.5.4	Role osy PD-1/PD-L1 u chronických infekcí	9
2	Cíle práce	11
3	Materiál a metody	12
3.1	Laboratorní myši	12
3.2	Borelie.....	12
3.3	Vliv anti-PD-L1 protilátky <i>in vitro</i>	13
3.3.1	Izolace kostní dřeně a derivace plazmacytoidních dendritických buněk (pDC).....	13
3.3.2	Priming T buněk.....	14
3.3.3	Aktivace pDC boreliemi, ošetření anti-PD-L1 protilátkou.....	14
3.3.4	Izolace splenocytů a magnetická separace T lymfocytů.....	15
3.3.5	Barvení pomocí Celltrace™ Violet Cell Proliferation Kit	15
3.3.6	Odběr, izolace RNA a reverzní transkripce.....	16
3.3.7	Stanovení regulačních T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie	16
3.3.8	Stanovení proliferace T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie.....	17
3.3.9	Kvantitativní Real–Time PCR.....	17
3.4	Vliv anti-PD-L1 protilátky <i>in vivo</i>	18
3.4.1	Infekce myši a ošetření anti-PD-L1 protilátkou	19

3.4.2	Měření velikosti kloubů.....	19
3.4.3	Odběr tkání na izolaci DNA, RNA a krve na sérologii	19
3.4.4	ELISA.....	20
3.4.5	Detekce borelií v myších orgánech	21
3.4.6	Stanovení proliferace a počtu T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie	21
3.5	Statistická analýza.....	22
4	Výsledky	23
4.1	Vliv anti-PD-L1 protilátky na T lymfocyty <i>in vitro</i>	23
4.2	Exprese PD-1 receptoru na T lymfocytech po ošetření anti-PD-L1 protilátkou <i>in vitro</i>	25
4.3	Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci T lymfocytů <i>in vitro</i>	28
4.1	Vliv aplikace anti-PD-L1 protilátky na myši infikované <i>B. burgdorferi in vivo</i>	30
4.1.1	Vliv anti-PD-L1 protilátky na rozvoj artritidy <i>in vivo</i>	30
4.1.2	Detekce <i>B. burgdorferi</i> v myších tkáních ošetřených anti-PD-L1 protilátkou <i>in vivo</i> ...	32
4.1.3	Vliv anti-PD-L1 protilátky na T lymfocyty <i>in vivo</i>	34
4.1.4	Změna exprese PD-1 receptoru na T lymfocytech po ošetření anti-PD-L1 protilátkou <i>in vivo</i>	37
4.1.5	Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci myších T lymfocytů <i>in vivo</i>	40
5	Diskuze	44
6	Shrnutí.....	49
7	Reference.....	50
8	Použité zkratky.....	57

1 Úvod

1.1 Rod *Borrelia*

Bakterie rodu *Borrelia* řadíme do řádu *Spirochaetales*, třídy *Spirochaetes* a kmene *Spirochaetae*. Spirochety rodu *Borrelia* byly poprvé pojmenovány po francouzském biologovi Amédeu Borrelovi a poprvé popsány Swellengrebelem roku 1907 (Margos et al., 2018). Rod *Borrelia* v současné době zahrnuje dvě hlavní skupiny spirochet se 43 ověřenými druhy, z nichž první skupina spirochet zahrnuje druhy *Borrelia* přenášené převážně klíšťaty rodu *Argasidae*, které jsou až na několik výjimek spojeny s lidskou návratnou horečkou (Guiqin, 2024). Druhá skupina obsahuje druhy *Borrelia* v rámci komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, která je přenášena klíšťaty rodu *Ixodes* a je spojována s lymeskou boreliózou. Dále byl popsán druh *B. turcica*, který je odlišný od druhů souvisejících s lymeskou nemocí a návratnou horečkou a je spojený s plazy (Margos et al., 2020; Hepner et al 2020). Distribuce jednotlivých druhů spirochet se liší napříč kontinenty. Různé druhy borelií vyvolávající lymeskou nemoc se liší zejména z hlediska manifestace v tkáních, šíření v lidském těle, ale také z hlediska exprese genů/antigenů (Guérin et al., 2023), a proto různé patogenní druhy borelií jsou spojeny s různými symptomy onemocnění, které lze pozorovat v pozdních stádiích lymeské boreliózy. Například *B. afzelii* je nejčastěji spojována s kožními projevy, *B. garinii* a *B. bavariensis* s neuroboreliózou a *B. burgdorferi* s artritickými symptomy boreliózy (Margos et al., 2011).

1.2 Klinika lymeské boreliózy

První zmínka o lymeské borelióze se objevuje už v roce 1883, kdy dermatolog Buchwald popsal onemocnění zvané acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) (Gade et al., 2023). V současnosti je lymeská borelióza nejrozšířenější infekcí přenášené klíšťaty s přibližně 476 000 případů ve Spojených státech a 650 000-850 000 případů v Evropě ročně. *Borrelia burgdorferi* má enzootický cyklus, ve kterém se střídá přechod spirochet z klíštěte do obratlovce (Strnad et al., 2023). Tento cyklus trvá obvykle 2 roky (Mahajan, 2023) a začíná, jakmile larva klíštěte saje na infikovaném hostiteli a spirocheta začne kolonizovat střední střevo klíštěte. Během následného sání část spirochet opouští střevo, prochází přes peritrofitickou membránu, vrstvy epitelárních buněk a bazální membránu do hemocelu a následně migrují do slinných žláz klíšťat, ze kterých jsou přeneseny do hostitelské dermis prostřednictvím slin. Borelie se poté šíří krví nebo lymfou do svých cílových orgánů, kde způsobují poškození, které může vyústit v rozvoj onemocnění a tím se enzootický cyklus ukončuje (Strnad et al., 2023).

Klinický konsenzus v současné době rozděluje lymeskou boreliózu na tři fáze. První je akutní lokalizovaná fáze, kdy se obvykle objevuje rozšiřující se kruhovitá, začervenalá kožní léze nazývaná erythema migrans (EM) (Garcia-Monco & Benach, 2019). Tato vyrážka vzniká v důsledku vzniku infekce v místě, kde došlo k přisátí klíštěte. Obvykle se projevuje v rozmezí 3 až 32 dnů od kousnutí klíštětem (Branda & Steere, 2021). EM může být doprovázena nespecifickými příznaky, jako je bolest hlavy, horečka, malátnost, únava, bolest svalů a kloubů (Hernández et al., 2023).

Pokud se infekce neléčí, nemoc přejde do časné diseminované fáze, kdy se borelie mohou šířit do jiných orgánových systémů včetně srdce, kde vznikají akutní srdeční problémy, při kterých dochází k přerušení elektrických impulzů ze síní do komor. Dále se borelie šíří do nervového systému a kloubů (Hernández et al., 2023; Steere et al., 2016). Neurologické poruchy se mohou objevit kdykoliv v rámci diseminovaného stádia a může být postižen jak centrální, tak periferní nervový systém (Garcia-Monco & Benach, 2019). U pacientů se může vyvinout akutní lymeská neuroborelióza, mezi jejíž nejběžnější příznaky patří lymfocytární meningitida s bolestmi hlavy, nebo Bannwarthův syndrom (Steere et al., 2016). Bannwarthův syndrom je charakteristický segmentálními bolestmi podobným pásovému oparu a u 60 % pacientů se dále rozvine deficit hlavových nervů, který vede k obličejové obrně (Rauer et al., 2018).

Chronická nebo pozdní lymeská borelióza se projevuje několik měsíců nebo let po počáteční infekci, nebo období latence. Charakteristickým znakem této fáze jsou ACA a chronická artritida. ACA postihuje převážně starší osoby a na rozdíl od EM se ACA vyskytuje na distálních částech končetin, zejména loktech, předloktích, kolenou a chodidlech, kde se vyvinou modročervené skvrny spojené se zánětem, které mohou přejít do chronické atrofie a fibrózy tkání. Chronická artritida postihuje u 90 % pacientů velké klouby, především kolena a kyčelní klouby (Mahajan, 2023). Otoky a bolesti přetrvávají i několik let po perorální antibiotické léčbě (Arvikar & Steere, 2022).

Důsledky infekce boreliemi mohou vést k přetrvávajícím symptomům i po antibiotické léčbě. Tyto symptomy se hromadně nazývají post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS). Příznaky PTLDS jsou způsobeny jak vrozeným, tak adaptivním imunitním systémem, který se snaží odstraňovat přetrvávající spirochety v těle. Mezi tyto symptomy patří zejména únava a bolest svalů. Ve studii Wong et al., 2022 se uvádí, že chronická artritida v rámci PTLDS je způsobena pomalým odstraňováním peptidoglykanu z kloubů. Tito autoři naznačují, že *B. burgdorferi* a její antigeny zůstanou patogenní i po léčbě antibiotiky,

a tudíž schopnost borelií adaptovat se na stres vyvolaný antibiotiky jim umožňuje vstoupit do perzistentní fáze podobné tvorbě biofilmu (Talbot et al., 2023; Wong et al., 2022).

1.3 Imunitní odpověď při infekci bakteriemi rodu *Borrelia*

Rozpoznání borelií představuje komplexní proces, na kterém se podílí více složek imunitního systému (Oosting et al., 2016). Vrozený imunitní systém hraje rozhodující roli jak v obraně hostitele proti *B. burgdorferi*, tak v závažnosti onemocnění. Rozpoznání *B. burgdorferi*, aktivace vrozeného imunitního systému, produkce prozánětlivých cytokinů a modulace adaptivních reakcí jsou iniciovány receptory rozpoznávající vzory (PRR), mezi které patří Toll-like receptory (TLR) exprimované na imunitních buňkách hostitele, např. dendritických buňkách, makrofázích nebo monocytech. Tyto receptory rozpoznávají molekulární vzory spojené s patogenem (pathogen-associated molecular patterns – PAMP). TLR mohou rozpoznat boreliový flagelin a řadu proteinů vnějšího povrchu borelií (např. OspA a OspB). Konkrétně byly TLR1 a TLR2 identifikovány jako receptory nejvíce relevantní pro lymeskou boreliózu. Interakce TLR s Osps *B. burgdorferi* hraje důležitou roli v počátečních fázích patogeneze lymeské boreliózy, protože spouští prozánětlivou kaskádu imunitních reakcí (Rahman et al., 2016).

Antigen prezentující buňky aktivují po prezentaci bakteriálního peptidu B a T lymfocyty. T buňky poté uvolňují cytokiny a stimulují aktivaci makrofágů, zatímco B buňky produkují specifické protilátky, které vážou epitopy vnější membrány borelií (Strnad et al., 2023). Během první fáze onemocnění produkují B buňky ve slezině IgM specifické protilátky proti *B. burgdorferi*. Následný vývoj IgG protilátek specifických pro *B. burgdorferi* koreluje se snížením počtu spirochet u myši a podávané IgG protilátky mohou zabránit vzniku infekce na zvířecích modelech. V tomto stádiu můžeme najít i protizánětlivý cytokin IL-10, jeho vyšší hladiny byly spojeny s mírnějšími symptomy lymeské boreliózy (Rahman et al., 2016; Steere et al., 2016). Studie ukázaly, že *B. burgdorferi* může způsobit zvýšené uvolňování IL-10 pomocí makrofágů i dendritických buněk. Tuto zvýšenou hladinu IL-10 může *B. burgdorferi* využít k potlačení časných reakcí během infekce (Lazarus et al., 2008; Chung et al., 2013).

Dendritické buňky (DC) jsou profesionální buňky prezentující antigen na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II, které detekují a zpracují antigen, aby ho mohly prezentovat CD4+ pomocným T buňkám po migraci do lymfatických uzlin, což vede k aktivaci a proliferaci CD4+ T buněk. DC se vyskytují hojně v kůži,

kde *B. burgdorferi* poprvé vstoupí do těla hostitele během sání klíštěte, a proto jsou DC rozhodující imunitní buňky pro určování vrozených a adaptivních imunitních reakcí proti boreliím. Kromě toho, že jsou borelie degradovány ve fagozómech DC a prezentovány CD4+ T buňkám, mohou se živé borelie také nacházet v cytoplazmě. V důsledku toho jsou borelie prezentovány i na molekulách MHC I. třídy, což vede k aktivaci CD8+ cytotoxických T buněk (Mason et al., 2014; Mason et al. 2018). Kromě dendritických buněk se na fagocytóze a prezentaci boreliových antigenů podílí i rezidentní makrofágy (Thompson et al., 2021).

CD4+ T buňky mohou hrát ústřední roli v imunitních reakcích a tvorbě protilátek proti *B. burgdorferi* pomocí rozvoje B lymfocytů a aktivace makrofágů, čímž se sníží zátěž tkáně spirochetami. Dále studie ukazují, že adaptivní přenos CD4+ T buněk produkujících IFN- γ do infikovaných myši *B. burgdorferi* s deficitem T buněk zmírní příznaky karditidy (Elsner et al., 2015).

Pozdější fáze lymeské boreliózy je charakterizovaná vysokou hladinou IFN- γ . Nízká hladina TLR2 u myši infikovaných *B. burgdorferi* vede ke zvýšenému počtu T buněk v kloubech, vysokým hladinám IFN- γ . Vysoké hladiny IFN- γ jsou také spojené s jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) v TLR1. Tento polymorfismus je charakterizován sníženou expresí tohoto receptoru, což má za následek zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů a zapříčiňuje zvýšenou přetrvávající artritidu i po antibiotické léčbě (Strle et al., 2012).

1.4 Únikové mechanismy imunitního systému

Aby *B. burgdorferi* mohly přetrvávat uvnitř hostitele a rozvinula se infekce, musí uniknout obranným reakcím hostitelského imunitního systému (Strnad et al., 2023).

Tyto imunitní úniky borelií začínají už jejich samotným tvarem a genomem. *Borrelia burgdorferi* se vyznačuje neobvykle segmentovaným genomem kódujícím mnoho proteinů, které jiné bakteriální druhy, a dokonce i příbuzné spirochety postrádají (Foor et al., 2023). Genom *B. burgdorferi* tvoří lineární chromozom, který obsahuje 900 genů kódujících proteiny pro replikaci, transkripci, translaci, energetický metabolismus a transmembránový transport. Borelie nemají žádné geny pro biosyntézu aminokyselin, mastných kyselin, enzymů, či nukleotidů, proto využívají metabolické dráhy hostitele. Genom borelií je dále obohacen o devět lineárních a 12 kruhových plazmidů, které společně obsahují geny důležité pro životní cyklus vektor-hostitel a napomáhají genetickým změnám, které borelie využívají ve prospěch

imunitních úniků v hostiteli (Kneubehl & Lopez, 2023; Berndtson, 2013). Bylo prokázáno, že mnoho z genových produktů má zásadní roli při přežití spirochet v jejich enzootickém cyklu. Například protein označovaný BB0323 je nezbytný pro přežití *B. burgdorferi* během celého infekčního cyklu, protože usnadňuje přenos patogenu mezi klíštětem a hostitelem tím, že napomáhá mikrobiálnímu úniku časné hostitelské buněčné imunitě (Foor et al., 2023). *B. burgdorferi* může prostřednictvím genové konverze, nebo změnou alelické exprese změnit své povrchové antigeny, zejména povrchového lipoproteinu VlsE, a tím se vyhnout detekci imunitním systémem hostitele. Rekombinace VlsE se zdá být důležitá pro perzistenci *B. burgdorferi* a schopnost *B. burgdorferi* reinfikovat hostitele po léčbě antibiotiky. Tato antigenní variace je spontánní s frekvencí 10^4 za jednu generaci (Kneubehl & Lopez, 2023).

B. burgdorferi indukuje u klíšťat mikrobicidní dráhy Toll, IMD a JAK/STAT, kterým se ale spirochety dokáží vyhýbat. O několika spirochetových proteinech OspA, OspC a BBE31 je známo, že interagují přímo s klíštěcími proteiny, aby podpořily kolonizaci *B. burgdorferi* ve střevě klíštěte (Rana et al., 2023). Morfologie spirochet napomáhá jejich pohyblivosti, která je nezbytná pro migraci ze střeva do slinných žláz a hraje důležitou roli v proniknutí do hostitelských tkání a následné perzistence v nich (Charon & Goldstein, 2002). V neposlední řadě část proteinů ve slinách klíšťat má imunomodulační vlastnosti, které zabraňují obraně hostitele během sání. Zatímco je klíště využívá k tomu, aby se nasýtilo, *B. burgdorferi* využívá některé z těchto slinných proteinů nebo jejich funkcí k přenosu z klíštěte do savčího hostitele. Jeden z proteinů, který spirochety využívají je protein Salp15. Salp15 inhibuje aktivaci CD4+ T buněk tím, že se váže na CD4 koreceptor a inhibuje buněčnou signalizaci. Společně to vede ke snížení produkce IL-2, který je nutný pro expanzi T buněk. Jiné slinné proteiny, jako je Iris a Iristatin, inhibují produkci několika prozánětlivých cytokinů, včetně IL-6, TNF- α a IFN- γ . Dále bylo zjištěno, že Salp15 narušuje dráhu spojenou se zráním dendritických buněk vazbou na lektinový receptor typu C (DC-SIGN, také známý jako CD209), tím inhibuje prezentaci antigenu a produkci prozánětlivých cytokinů (Nuttall P. A., 2023). Účinky inhibičních proteinů jsou lokalizované v místě sání a jejich aktivita do 24 hodin klesá (Berndtson, 2013). Kromě vlivu na inhibice produkce cytokinů, je prokázáno, že Salp15 se váže na vnější povrchový protein OspC na boreliích, čímž chrání spirochetu před usmrcením protilátkami. Jiné proteiny slinných žláz, jako je inhibiční protein B buněk (BIP), inhibují proliferaci a aktivaci B buněk. Další proteiny Salp20, TSLPI a IRAC zabraňují komplementu lýzu borelií a fagocytózu neutrofilů (Helble et al., 2021).

Adheze je počáteční událostí při vzniku jakékoliv infekce. Genom *B. burgdorferi* kóduje velké množství proteinů nazývaných adhesiny. Spirochety pomocí těchto proteinů adherují k hostitelským tkáním a šíří se v nich. Hlavním adhezivním cílem je extracelulární matrix (ECM), která hraje důležitou roli v patogenezi borelií a jejich perzistenci v hostiteli. *B. burgdorferi* váže různé složky ECM, včetně glykosaminoglykanů, fibronektinu, dekorinu, kolagenu, lamininu a integrinů. Kromě toho *B. burgdorferi* přilne k řadě typů hostitelských buněk a váže složky hostitelského séra a extracelulárních tekutin, jako je plazminogen a regulátory komplementu, například CspA (Brissette & Gaultney, 2014).

Bylo popsáno, že spirochety se vyhýbají komplementovým drahám třemi hlavními způsoby: převzetí hostitelských regulátorů komplementu, dále vlastními faktory, které ovlivňují systém komplementu hostitele a využíváním klíčících proteinů. Aby se borelie chránily a vyhnuly se napadení komplementovým systémem, vážou na svůj povrch regulační proteiny komplementu faktor H a faktor HL-1 (FH/FHL-1), které zodpovídají za inhibici tvorby a aktivity C3 konvertázy. Bylo identifikováno až pět odlišných lipoproteinů, které interagují s FH/FHL-1 a souhrnně se nazývají CRASPs. Jedním z těchto proteinů vázající faktor H je CspA, také známý jako komplementový regulátor získávající povrchový protein-1 (CRASP-1). Mezi další FH/FHL-1 vazebné proteiny patří CspZ a rodina OspE. Rodina povrchových proteinů OspE jsou souhrnně označovány jako OspE-related proteins (Erp) a inaktivují C3b složku komplementu. Bylo zjištěno, že sekvence kódující CspA, stejně jako sekvence OspE se vyskytují pouze v rodu *Borrelia*. U CspZ proteinu bylo prokázáno, že je exprimován spirochétami pouze během infekce savců, zatímco CspA je exprimován zejména během přenosu klíště-hostitel a hostitel-klíště. Aktivita OspE, CspA a CspZ je synergická, protože se váží na různé oblasti FH (Dulipati et al., 2020).

1.5 Inhibiční kontrolní body imunitního systému

Kontrolní body imunitního systému jsou definovány jako interakce určitých receptorů na povrchu buněk s určitými ligandy, které mají inhibiční nebo aktivační účinky na imunitní reakce (Zhang & Zheng, 2020). V současnosti jsou nejvíce prozkoumané imunitní kontrolní body hlavně PD-1 (programmed death 1) a jeho ligand PD-L1 (programmed death-ligand 1), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) a LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3). Mezi další kontrolní body patří TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3), CD47, TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain protein) a VISTA (V-domain Ig suppressor of T-cell activation) (Yin et al., 2023). Po navázání

na odpovídající ligandy hrají imunitní kontrolní body klíčovou roli pro udržení autotolerance pomocí regulace intenzity a délky imunitních odpovědí u efektorových buněk v různých tkáních tak, aby se minimalizovalo poškození tkáně (Zhang & Zheng, 2020).

1.5.1 Mechanismus působení kontrolních bodů CTLA-4 a PD-1

CTLA-4 a PD-1/PD-L1 mají velmi odlišné role v imunitní regulaci. CTLA-4 je receptor pro kostimulační proteiny B7-1(CD80) a B7-2 (CD86) exprimované na buňkách prezentující antigen (APC). Jelikož CTLA-4 má vyšší afinitu k CD28, tak brání B7 v interakci s kostimulačním receptorem CD28 na T buňkách, CTLA-4 tak snižuje aktivaci naivních T lymfocytů a může ovlivňovat již probíhající zánětlivou reakci. Regulační T lymfocyty exprimují vysoké hladiny CTLA-4, což jim umožňuje vázat se na CD80 a CD86 na dendritických buňkách a fyzicky odstraňovat tyto ligandy z membrány DC, což zabraňuje následné aktivaci T buněk těmito DC. Zvířata s deficitem CTLA-4 umírají krátce po narození na převažující autoimunitu zahrnující více orgánů, včetně dýchacích svalů (Wang et al., 2023).

PD-1 je inhibiční receptor exprimovaný na aktivovaných T buňkách, který přímo inhibuje signalizaci T buněčného receptoru T lymfocytů (TCR) a CD28 prostřednictvím vazby na jeden ze svých ligandů PD-L1, nebo PD-L2. PD-L2 je exprimovaný hlavně na aktivovaných imunitních buňkách, ale na tento ligand není farmakologie v různých terapiích zacílená. Častěji exprimovaný je PD-L1, jehož exprese může být zvýšena ve zdravých i maligních tkáních reakcí na různé zánětlivé a stresové signály imunitního systému, včetně IFN- γ produkovaného aktivovanými T buňkami (Wang et al., 2023). Zatímco souvislost mezi regulačními T lymfocyty (Tregs) a CTLA-4 je dobře známá, vliv osy PD-1/PD-L1 na Tregs není zatím zcela objasněný. Ale vzhledem k supresorové funkci PD-1 může jeho nedostatek na Tregs zvýšit inhibici imunitních reakcí vůči antigenu (Grabie et al., 2019).

1.5.2 Inhibiční dráha PD-1/PD-L1

Koinhibiční receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1, také známý jako PDCD1 a CD279) a jeho ligand programované smrti 1 (PD-L1, také známý jako CD274 a B7-H1) jsou klíčové imunosupresivní signály pro udržení centrální a periferní imunitní tolerance, inhibici autoimunitních reakcí a regulaci imunitní homeostázy. PD-L1 je třetí člen rodiny B7 a transmembránový protein typu I obsahující 290 aminokyselin. U lidí se nachází na chromozomu 9. Poprvé byl popsán Dongem et al. v roce 1999 jako B7-H1. PD-L1 je transmembránový protein a skládá se z extracelulárních domén podobných IgV a IgC,

hydrofobní transmembránové domény a krátkého cytoplazmatického konce složeného z 30 aminokyselin. Exprese PD-L1 se realizuje v brzlíku a na dendritických buňkách, kde osa PD-1/PD-L1 brání proliferaci a diferenciaci naivních T buněk (Kythreotou et al., 2018; Zhou et al., 2023).

Osa PD-1/PD-L1 hraje důležitou roli v odpovědi T buněk, kdy může inhibovat aktivaci T buněk, proliferaci, sekreci cytokinů a indukovat apoptózu (Zhao et al., 2023). Při chronické infekci brání tato dráha destrukci tkáně pomocí imunitního vyčerpání, čímž se poškodí funkce efektorových buněk po přetrvávající perzistenci antigenu. Vyčerpání T buněk je charakteristické ztrátou produkce IL-2, sníženou proliferační kapacitou, sníženou cytotoxicitou, zhoršenou produkcí prozánětlivých cytokinů a expresí kontrolních bodů imunitního systému jako jsou právě PD-1 a PD-L1 (Zhao et al., 2023; Dyck & Mills, 2017; Kythreotou et al., 2018).

Dráha PD1/PD-L1 může velmi ovlivnit fyziologii hostitele. U geneticky upravených myší s deficitem v PD-1 se rozvinuly autoimunitní reakce (Sharpe & Pauken, 2018). Na druhou stranu vysoká a přetrvávající exprese PD-1 a jeho ligandů je běžná u chronických infekcí a nádorových onemocnění, u kterých zablokování této dráhy vede ke zlepšení efektorových funkcí T buněk. PD-1 je exprimovaný na všech CD4+ a CD8+ T lymfocytech, regulačních T buňkách a některých podskupinách paměťových T buněk během jejich přirozené aktivace. PD-1 je kromě T lymfocytů dále exprimovaný na NK buňkách, některých myeloidních buňkách, nádorových buňkách a B buňkách. Dráha PD-1/PD-L1 hraje dále klíčovou roli v regulaci humorální imunity. Během humorálních imunitních odpovědí mohou B buňky exprimovat PD-1, jehož vysoká hladina je nezbytná pro afinitní maturaci B lymfocytů a izotypový přesmyk (Sharpe & Pauken, 2018).

1.5.3 Imunitní kontrolní body u nádorových onemocnění

Rakovinné buňky si mohou vyvinout různé mechanismy, jak se vyhnout imunitnímu systému, což následně vede k rozvinutí onemocnění. Jedním z těchto mechanismů jsou imunitní kontrolní body, kterými se rakovinné buňky v těle maskují. V posledních letech byly učiněny velké průlomy v nádorové imunoterapii, které významně zlepšily míru přežití pacientů s rakovinou. K dnešnímu dni existují různé typy imunoterapeutických léků, včetně nádorových vakcín, buněčné imunoterapie, imunomodulačních léků zaměřených na T buňky a inhibitorů imunitních kontrolních bodů (ICI). Protilátky proti CTLA-4 a PD-1/PD-L1 se díky detailním studiím prokázaly jako nejvíce efektivní v protinádorové terapii u maligních nádorů,

jako je karcinom močového měchýře a ledvin, melanom, nemalobuněčný karcinom plic, kolorektální karcinom a Hodgkinův lymfom a jsou široce používány v klinické praxi. Celosvětově běžně používané inhibitory imunitních kontrolních bodů zahrnují hlavní tři kategorie: monoklonální protilátky anti-PD-1/PD-L1, anti-CTLA-4 monoklonální protilátky, kombinované inhibitory anti-PD-1 a CTLA-4 (Yin et al., 2023). Rychlé rozpoznání nádorově specifických antigenů T buňkami je základem imunoterapie nádorových onemocnění. Aktivované CD8⁺ T buňky pomocí perforinů a granzymů zabíjejí nádorové buňky narušením plazmatické membrány. Nádorové buňky poté apoptoticky umírají. Dále Th1 buňky vylučující IFN- γ hrají klíčovou roli při kontrole růstu nádoru (Apetoh et al., 2015; Ahmed et al., 2022). Další studie uvádí, že potlačení protinádorových odpovědí T buněk je z velké části zprostředkováno regulačními T lymfocyty. Jedním pokrokem v účinné imunoterapii je právě vyčerpání Tregs, jelikož se zjistilo, že vysoká infiltrace Tregs v místě nádoru potlačuje produkci TGF- β a IL-10 aktivitu zmíněných efektorových T buněk a APC proti rakovinným buňkám a podporují angiogenezi nádorů, což zhoršuje prognózu onemocnění (Zeng et al., 2020).

1.5.4 Role osy PD-1/PD-L1 u chronických infekcí

Dráha PD-1/PD-L1 byla také zkoumána v kontextu chronických infekcí. Například gastrointestinální patogen *Helicobacter pylori* vyvolává u lidí chronické infekce vedoucí ke gastroduodenálním vředům a rakovině žaludku (Jubel et al., 2020). Infekce *H. pylori* indukuje expresi PD-L1 v žaludečních epiteliálních buňkách, tím zhoršuje prognózu rakoviny žaludku a podporuje bakteriální perzistenci. Role osy PD-1/PD-L1 u infekce *H. pylori* však není stále zcela objasněna (Wang et al., 2023). Základním patogenem spojeným s parodontitidou je orální anaerobní bakterie *Porphyromonas gingivalis*. Studie zjistily zvýšenou expresi PD-1/PD-L1 v periodontálních tkáních a periferní krvi pacientů s periodontitidou. Tato zvýšená exprese snižuje zánětlivou odpověď a umožňuje *P. gingivalis* únik imunitním reakcím hostitele (Liu et al., 2023). V další studii data ukazují, že exprese PD-1 na B buňkách potlačuje humorální odpověď na *Streptococcus pneumoniae* pomocí potlačení klonální expanze a produkce IgG B buňkami specifickými pro antigeny *S. pneumoniae* (McKay et al., 2015). Dále se zjistilo, že PD-1 na dendritických buňkách potlačuje obrané reakce imunitního systému proti *Listeria monocytogenes* a adoptivní přenos dendritických buněk s deficitem PD-1 zvyšuje vrozenou imunitu proti infekci *L. monocytogenes in vivo* (Yao et al., 2009). Zvýšená exprese PD-1/PD-L1 byla nalezena i v makrofázích v kostní dřeni u myši s osteomyelitidou způsobenou bakterií *Staphylococcus*

aureus. *S. aureus* pomocí signalizace PD-1/PD-L1 potlačuje baktericidní aktivitu makrofágů. Blokováním osy PD-1/PD-L1 se u myši infikovanými *S. aureus* podpořila odstranění bakterií, což zabránilo destrukci kosti (Li et al., 2023).

Role PD-1/PD-L1 byla popsána i u virových infekcí včetně hepatitidy B, hepatitidy C, HIV a akutní virové infekce, jako je Hantavirus a Ebola. Studie ukázaly zvýšenou expresi PD-1 a zhoršenou funkci T buněk i u pacientů s COVID-19 (Barnova et al., 2021; Vivarelli et al., 2021). Vyčerpání T buněk bylo popsáno také během infekce řadou parazitických prvoků. Chronické infekce v kontextu parazitární infekce jsou běžné kvůli schopnosti parazitů unikat imunitnímu systému zvýšením protizánětlivých molekul, jako je TGF- β a IL-10. Parazitární infekce jsou navíc spojeny se zvýšenou expresí koinhibičních receptorů a jejich ligandů. Například byla popsána zvýšená exprese PD-1 u přetrvávajících infekcí *T. gondii*, *Leishmania major* a *Plasmodium falciparum* (Jubel et al., 2020).

Mnoho klinických studií prokázalo korelaci mezi zvýšenou expresí PD-1 nebo PD-L1 a mortalitou na sepsi. Pacienti se sepsí mají zvýšenou povrchovou expresi PD-1 na T lymfocytech a zvýšenou povrchovou expresi PD-L1 na myeloidních buňkách. Většina těchto studií ukazuje, že stimulace osy PD-1/PD-L1 během sepse vede k dysfunkci T buněk a apoptóze, která je doprovázena zvýšením množství patogenů, multiorgánovým poškozením a následnou smrtí (Patil et al., 2017). Četné preklinické studie ukázaly, že zacílení na PD-1 a PD-L1 během sepse zlepšuje odolnost pacienta vůči infekci (Chen et al., 2023).

2 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši o lymeské borelióze a úloze kontrolních bodů imunitního systému, především dráhy PD-1/PD-L1, v rozvoji bakteriálních infekcí.
- Charakterizovat roli osy PD-1/PD-L1 při infekci spirochetami *Borrelia burgdorferi* u myších buněk *in vitro*
- Vyhodnotit vliv aplikace neutralizační anti-PD-L1 protilátky na laboratorní myši infikovaných spirochetami *Borrelia burgdorferi in vivo* a *ex vivo* zaměřené na níže uvedené parametry:
 - Diseminace borelií do cílových tkání a rozvoj lymeské artritidy
 - Proliferace T lymfocytů a indukce regulačních T buněk
 - Odpověď imunitního systému infikované myši na vystavení spirochetám

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní myši

Jako zdroj imunokompetentních buněk i pro *in vivo* pokusy byly použity myši inbredního kmene C57BL/6N (wild-type), které byly získány od Janvier Labs. Na začátku pokusu byly myši staré osm týdnů a vážily mezi 18 a 20 gramy. Chovány byly ve sterilním prostředí IVC (individually ventilated cages) boxů s podestýlkou z dřevěné neprášivé drtě a ubrouskem pro stavbu hnízda, při fotoperiodě 12/12 hodin, za stálé teploty (22 °C) a relativní vlhkosti vzduchu (65 %), krmení a voda byly podávány *ad libitum*. K tomuto účelu byly využity prostory BSL-2 zvěřince Katedry medicínské biologie.

3.2 Borelie

Spirochety *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen ATCC[®] 35211TM) byly kultivovány v médiu BSK-H doplněném 6% králíčím sérem při 34 °C do log fáze ($\approx 2 \times 10^7$ /ml) a poté použity v experimentech.

Z kultury borelií bylo odebráno 3,5 μ l suspenze na podložní sklíčko, kapka byla překryta krycím sklíčkem a následně pozorována mikroskopii v temném poli při 400násobném zvětšení. Po spočítání spirochet ve 20 zorných polích byl k zjištění počtu borelií v 1 ml suspenze použit vzorec:

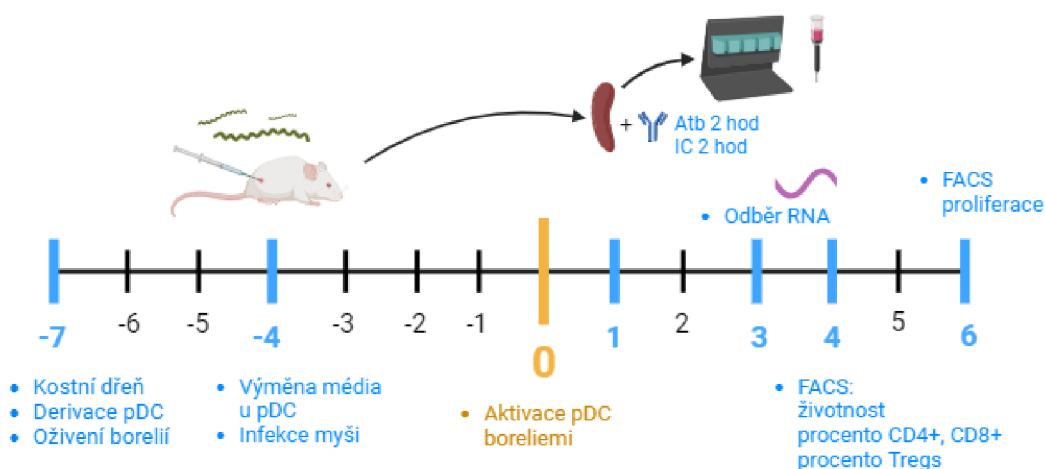
$$\text{počet borelií /ml} = a \times \text{ředění} \times 5,01 \times 10^5$$

a..... průměrný počet borelií ve 20 zorných polích

Z boreliové kultury bylo poté odebráno takové množství suspenze, aby obsahovalo požadovaný počet borelií.

3.3 Vliv anti-PD-L1 protilátky *in vitro*

Plán *in vitro* experimentu je znázorněn na Obr. 1. Jednotlivé kroky jsou popsány v následujících kapitolách.



Obr.1: Časové schéma *in vitro* experimentu

3.3.1 Izolace kostní dřeně a derivace plazmacytoidních dendritických buněk (pDC)

Myš byla uvedena do celkové inhalační anestézie a poté byla usmrcena zlomením vazy. Dále byla myš upevněna na chirurgickou podložku do polohy na zádech a její srst byla dezinfikována 70 % ethanolem. Následně byly vypreparovány zadní končetiny, které byly vloženy do sterilního PBS (phosphate-buffered saline; VWR). Očištěné stehenní a holenní kosti byly nejdříve vloženy do izopropanolu a poté do MEM (Minimal Essential Medium; Biosera). Kostní dřeň byla uvolněna z kostí pomocí propláchnutí médiem 5 ml injekční stříkačkou s jehlou o velikosti 24-25 G pomocí MEM.

Kostní dřeň byla následně rozsuspendována a přefiltrována přes sterilní buněčné síto (Corning, 70 μ m Nylon) do zkumavky.

Dále byly buňky centrifugovány (130 g, 10 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a byla provedena lýza erytrocytů pomocí 2 ml 0,84 % NH_4Cl ohřátého na 37 °C přidaného k peletu. Lýza erytrocytů byla zastavena po 2 minutách přidáním 10 ml MEM. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce pomocí Trypanové modři (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich) ředěné 1:1.

Nakonec se určené množství buněk dalo znovu centrifugovat a následně byly buňky převedeny do kultivačního média pro derivaci pDC (RPMI 1640, 10% fetální telecí sérum; Cytiva, Penicillin 100 j./ml, Streptomycin 100 μ g/ml, L-Alanyl-L-Glutamine 0,446 g/l,

2-Mercaptoethanol 50 μ M; Biowest, pyruvát sodný 1mM; Sigma, Flt-3L 200 ng/ml; R&D). Buňky byly následně nasazeny na 6-jamkový panel (3×10^6 buněk/jedna jamka) a kultivovány při 37 °C a 5 % CO₂.

Výměna média byla uskutečněna třetí den od derivace pDC, kdy bylo odsáto 800 μ l starého média a znovu přidáno 1 ml čerstvého média. Derivace pDC byla dokončena po sedmi dnech, kdy se buňky aktivovaly přidáním borelií.

3.3.2 Priming T buněk

Myš byla uvedena do celkové anestezie (ketamin 100mg/kg, xylazin 16mg/kg i.p.) a poté infikována intradermálně 1×10^5 spirochet *B. burgdorferi* 4-5 dní před odběrem sleziny za účelem tzv. primingu T buněk.

3.3.3 Aktivace pDC boreliemi, ošetření anti-PD-L1 protilátkou

Plazmacytoidní dendritické buňky (5×10^4 buněk/jamka) byly aktivovány pomocí borelií (5×10^5 buněk/jamka, MOI 10) po dobu 24 hodin. Neutralizační anti-PD-L1 protilátka (BioXCell InVivoMAb, c = 20 μ g/ml) nebo příslušná izotypová kontrola (c = 20 μ g/ml) byly přidány k pDC s boreliemi 2 hodiny před začátkem kokultivace s T buňkami.

3.3.4 Izolace splenocytů a magnetická separace T lymfocytů

Boreliemi infikovaná myš byla uvedena do celkové inhalační anestézie, usmrcena zlomením vazů a z dutiny břišní byla odebrána slezina pomocí sterilních nůžek a pinzety. Slezina byla poté daná do 15 ml zkumavky kompletního RPMI 1640 (10% fetální telecí sérum; Cytiva, Penicillin 100 j./ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Alanyl-L-Glutamine 0,446 g/l, 2-Mercaptoethanol 50 µM; Biowest, pyruvát sodný 1mM; Sigma, Flt-3L 200 ng/ml; R&D). Následně pro vytvoření jednobuněčné suspenze splenocytů byl orgán umístěn do buněčného síta v Petriho misce obsahující vychlazené RPMI. Pomocí pístu 5 ml injekční stříkačky byla slezina protlačena přes buněčné síto (Corning, 70 µm Nylon). Buněčná suspenze byla přenesena do nové 15 ml zkumavky a poté byla provedena centrifugace (130 g, 10 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a byla provedena lýza erytrocytů rozsuspendováním peletu buněk v 2 ml 0,84 % NH₄Cl ohřátého na 37°C. Po dvou minutách byla lýza zastavena přidáním 10 ml kompletního RPMI. Splenocyty byly následně spočítány v Bürkerově komůrce. Z určitého množství splenocytů byly izolovány T lymfocyty negativní magnetickou separací pomocí kitu Pan T Cell Isolation kit II mouse (Miltenyi Biotec) dle protokolu výrobce. Splenocyty byly rozsuspendovány v MACS pufru (PBS, 2% BOFES, 2 mM EDTA) 40 µl na každých 10⁷ buněk a k tomuto bylo přidáno 10 µl směsi protilátek s navázaným biotinem (Biotin Antibody cocktail) na každých 10⁷ buněk. Směs byla promíchána a inkubována 10 min ve tmě v lednici (4-8 °C). Po inkubaci bylo přidáno 30 µl MACS pufru a magnetické kuličky (Anti-Biotin MicroBeads) v množství 20 µl na každých 10⁷ buněk a znovu byla směs promíchána a ponechána v lednici po dobu 10 minut. Kolonka byla umístěna do magnetického stojanu a byl nasazen separační filtr. Kolonka byla aktivována promytím 3 ml MACS pufru. Buňky po inkubaci s magnetickými kuličkami byly nanесeny na kolonku. Po prokapání buněk kolonkou byla kolonka promyta 3 ml MACS pufru. T buňky prošly kolonkou do připravené 15 ml zkumavky.

3.3.5 Barvení pomocí Celltrace™ Violet Cell Proliferation Kit

Splenocyty byly označeny pomocí barviva CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (Invitrogen™) excitovaného fialovým laserem průtokového cytometru.

Barvivo bylo připraveno smícháním 1 ml sterilního PBS a 2 µl CellTrace Violet, které bylo přidáno k buněčnému peletu a inkubováno 20 minut ve tmě v 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 5 ml RPMI pro zastavení reakce. Dále se označené buňky daly

centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Nakonec obarvené splenocyty (3×10^5 /jamka) byly přidány k pDC aktivovanými boreliemi, z kterých těsně předtím bylo odsáto 170 μ l média.

3.3.6 Odběr, izolace RNA a reverzní transkripce

Izolace RNA byla provedena 48 hodin od kokultivace s T buňkami pomocí kitu NucleoSpin RNA Isolation Kit (Macherey – Nagel) dle protokolu výrobce. Obsah jamek z 24 jamkového panelu byl přenesen do zkumavek a následně centrifugován (500g, 5 min, pokojová teplota). Mezitím bylo do panelu přidáno 350 μ l lyzačního pufru RA1 z kitu a 3,5 μ l merkaptoethanolu. Po centrifugaci byl odebrán supernatant na další experimenty a k peletu byl přenesený obsah jamek. Poté pokus pokračoval s izolací RNA podle protokolu výrobce kitu v digestoři za RNase-free podmínek. Nakonec byla změřena koncentrace RNA na přístroji NanoPhotometer P 330 Implen a vzorky byly uchovány v mrazáku na -80°C.

Extrahovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Vzorky pro reverzní transkripci byly připraveny podle následující tabulky (Tab. I). Vzniklá cDNA byla 5x zředěna PCR vodou a uložena při teplotě -20°C.

Proces reverzní transkripce připravených reakčních směsí probíhal v thermocycleru (GeneAmp® PCR System 9700) za těchto podmínek: 55 °C po dobu 30 min, 85 °C po dobu 5 min (zde probíhala inaktivace reverzní transkriptázy) a neomezené chlazení při 4 °C.

Tab I: Reakční směs na přípravu reverzní transkripce pro 1 vzorek (20 μ l)

Pufr	4 μ l
Inhibitor RNáz	0,5 μ l
dNTPs	2 μ l
Oligo dT primer	1 μ l
Reverzní transkriptáza	0,5 μ l
RNA	250 ng v maximálním objemu 12 μ l
Voda	Dodána do celkového objemu 20 μ l

3.3.7 Stanovení regulačních T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie

V určeném časovém intervalu po inkubaci s pDC (72 h) byly T lymfocyty označeny protilátkami proti povrchovým antigenům CD3, CD4 a CD25 konjugovanými s fluorochromy. Dále byly buňky fixovány a permeabilizovány pomocí eBioscience™ FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set dle protokolu výrobce a značeny anti-FoxP3 protilátkou

konjugovanou s fluorochromem. Buňky byly analyzovány na průtokovém cytometru NovoCyte 3000 (Acea) pomocí softwaru NovoExpress.

- CD3 (eBioscience™, FITC, ředění 200×)
- CD4 (eBioscience™, PE, ředění 200×)
- CD25 (eBioscience™, SuperBright600, ředění 160×)
- FoxP3 (eBioscience™, eFluor450, ředění 300×)

3.3.8 Stanovení proliferace T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie

Po 5 dnech kokultivace pDC s T lymfocyty byla suspenze buněk přenesena z 96-jamkového panelu do zkumavek a vzorky byly centrifugovány (500g, 5 min, 4 °C). Po centrifugaci byly buňky převedeny do FACS pufru (2% BOFES v PBS) a označeny proti povrchovým antigenům:

- CD4 (eBioscience™, PE, ředění 200×)
- CD8 (eBioscience™, PE-Cyanine7, ředění 400×)

Vzorky s protilátkami byly společně inkubovány po dobu 20 minut ve tmě na ledu. Poté zbytky nenavázané protilátky byly vymyty FACS puftrem. Nakonec byly označené buňky změřeny na průtokovém cytometru NovoCyte 3000 (Acea) a výsledná data byla analyzována pomocí softwaru NovoExpress.

3.3.9 Kvantitativní Real–Time PCR

Sekvence primerů jsou zobrazeny v tabulce II a použité reakční komponenty jsou vypsány v tabulce III.

Tab. II: Přehled použitých primerů:

Gen	Název	Sekvence	Citace
FoxP3	mFOXP3-Fwd	CAGCTCTGCTGGCGAAAGTG	Duan et al. 2017
	mFOXP3-Rev	TCGTCTGAAGGCAGAGTCAGGA	
TGF-β	mTGFb-Fwd	TGTGGA ACTCTACCAGAAATATAGC	Duan et al. 2017
	mTGFb-Rev	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTC	
PD-1	mPD1-Fwd	CGTCCCTCAGTCAAGAGGAG	Lu et al. 2014
	mPD1-Rev	GTCCCTAGAAGTGCCCAACA	
GAPDH	mGADPH-Fwd	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	Duan et al. 2017
	mGADPH-Rev	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	
18S rRNA	m18rRNA-Fwd	CTTAGAGGGACAAGTGCGC	Stephens et al. 2011
	m18rRNA-Rev	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA	

Tab. III: Složení qPCR reakce (10 µl)

Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche)	5 µl
PCR voda	3,4 µl
Primery (10 µM)	0,3 + 0,3 µl
5x ředěná cDNA	1 µl

Vzorky byly pipetovány v technických duplikátech a vždy k nim byl přiřazen jeden duplikát NTC (no template control), do kterého místo 1 µl cDNA byl přidán 1 µl PCR vody.

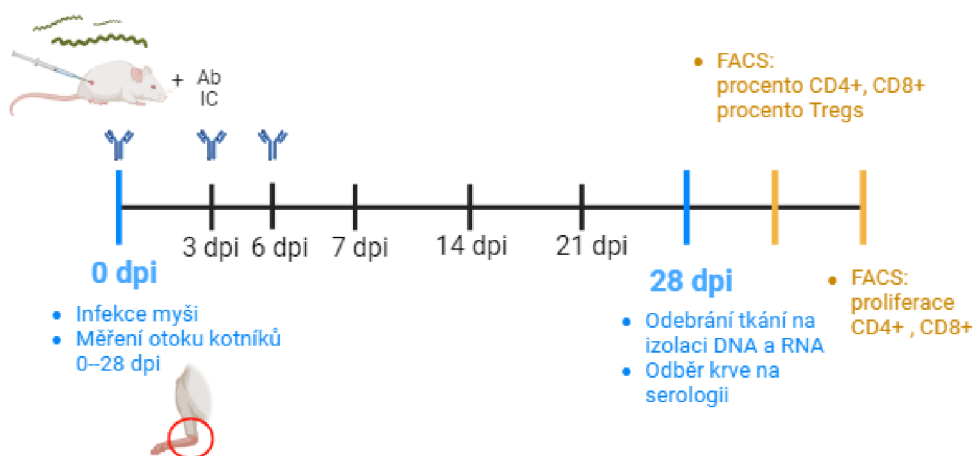
Takto připravené vzorky byly vloženy do termocycleru Rotor-gene 6000 (Corbett Research), kde byly vystaveny nejdříve počáteční 10 min. denaturaci při 95°C a následoval 45x opakovaný cyklus, který se skládal z:

1. Denaturace, 15 sekund, 95 °C
2. Nasedání primerů, 10 sekund, 60 °C
3. Syntetizování DNA vláken, 30 sekund, 72 °C.

Analýza křivky tání probíhala při teplotě 70–95 °C a data byla vyhodnocována pomocí Livakovy metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Jako referenční geny sloužily GAPDH a 18s rRNA.

3.4 Vliv anti-PD-L1 protilátky *in vivo*

Plán *in vivo* experimentu je znázorněn na Obr. 2. Jednotlivé kroky jsou popsány v následujících kapitolách.



Obr. 2: Časové schéma *in vivo* experimentu

3.4.1 Infekce myši a ošetření anti-PD-L1 protilátkou

Myši byly rozděleny do tří skupin, jak je vidět na obrázku 3. Následně byla každá myš uvedena do celkové anestézie (ketamin 100 mg/kg, xylazin 16 mg/kg i.p.). První kontrolní skupině myši bylo podáváno pouze BSK-H médium s 6 % králíčího séra a ATB. Druhá a třetí skupina byla infikovaná boreliemi (1×10^5 /myš i.d.), přičemž druhé skupině byla podávána ve třech pravidelných intervalech po třech dnech i.p. izotypová kontrola (250 μ g/myš) a třetí skupina myši byla ošetřena anti-PD-L1 protilátkou i.p. (250 μ g/myš).



Obr. 3: Specifikace myších skupin v *in vivo* experimentu

3.4.2 Měření velikosti kloubů

Na počátku experimentu a dále v sedmidenních intervalech byly pomocí digitálního caliperu Mitutoyo ABSOLUTE Digimatic Micrometer 0–15 mm změřeny rozměry levého i pravého tibiotarzálního kloubu v předozadním směru.

3.4.3 Odběr tkání na izolaci DNA, RNA a krve na sérologii

Každá myš byla před terminálním odběrem krve a tkání uvedena do celkové anestezie (ketamin 100 mg/kg, xylazin 16 mg/kg i.p.). Následně byly jednotlivé myši upevněny na chirurgickou podložku do polohy na zádech a jejich srst byla sterilizována 70 % ethanolem. Poté bylo určeno umístění klíční kosti a pomocí sterilních nástrojů byl přerušen axilární pletenec. Krev byla odebírána sterilní Pasteurovou pipetou do příslušné zkumavky. Následně byla krev centrifugována 10 min na 700 g pro získání séra, které bylo použito v sérologické metodě ELISA.

Myši byly po vykrvení usmrceny zlomením vazů, a následně jim byly odebírány příslušné orgány. Na izolaci DNA byla odebrána kůže z místa inokulace borelií, ušní boltce, močový měchýř, hrot srdeční, kotník a poté následovala samotná izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey – Nagel) dle protokolu. Získaná DNA byla zamražena na -20 °C a poté použita na kvantitativní Real-Time PCR pro detekci borelií (viz kapitola 2.4.5).

Na izolaci RNA byly potřeba kotníky a část sleziny. Odebrané sleziny byly rozděleny na třetiny. Jedna třetina byla použita pro izolaci RNA, která byla provedena pomocí kitu NucleoSpin RNA Isolation Kit (Macherey – Nagel) dle protokolu. Dvě třetiny sleziny byly využity pro analýzu pomocí průtokového cytometru (viz kapitola 2.4.6).

3.4.4 ELISA

Z odebraných sér byl zjišťován titer protilátek proti boreliovému antigenu podle následujícího postupu.

První den byl navázán boreliový antigen na 96-jamkovou mikrotitrační destičku (Costar) o koncentraci 10 µg/ml vazebného roztoku (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ v 1 l H₂O, pH 9,6), na každou jamku 50 µl. Poté byla provedena inkubace po dobu 24 hodin při 4 °C ve vlhké komůrce.

Druhý den byl panel vysušen poklepem a filtračním papírem. Dále byly vyblokovány nespecifické vazby blokovacím pufrům (5 % PTS v PBS, 200 µl/j) po dobu 45 min. při 37 °C ve vlhké komůrce. Následně byl panel promyt promývacím roztokem T-PBS (0,05 % Tween v PBS). Testovaná myšička séra byla naředěna 1:100 v ředícím roztoku (2 % PTS v PBS) a nanášena do předem určených jamek. Do ostatních jamek mikrotitračního panelu bylo nanášeno 50 µl ředícího roztoku. Vzorky byly dále rozředěny dvojkovou řadou. Panel se poté opět nechal inkubovat 45 min při 37 °C. Po inkubaci byl panel třikrát promyt v T-PBS. Následně byla přidána anti-myšička protilátka značená peroxidázou (Goat anti mouse/Px) ředěná v ředícím pufru 1:1000, 100 µl na jamku. Poté byla provedena inkubace 45 min. při 37 °C a po ní byl panel třikrát promyt v T-PBS. Enzymová reakce byla vyvolána 100 µl substrátového roztoku, který byl připraven těsně před použitím:

- 5 ml fosfocitrátového pufru
- 2 mg OPD
- 2 µl 30 % H₂O₂

Nakonec podle intenzity zbarvení negativní kontroly byla reakce zastavena přidáním 100 µl 2M H₂SO₄. Absorbance byla změřena na vertikálním spektrofotometru při vlnové délce 490 nm.

3.4.5 Detekce borelií v myších orgánech

Z myších orgánů byla vyizolovaná genomová DNA pomocí komerčního kitu Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel).

Následně byla provedena qPCR pro detekci borelií v tkáních v technických triplikátech, vždy k nim byl přiřazen jeden triplikát NTC (no template control), do kterého místo 4 μ l cDNA bylo přidáno 4 μ l PCR vody. Sekvence primerů a sondy jsou zobrazeny v tabulce IV a použité reakční komponenty jsou vypsány v tabulce V.

Tab. IV: Přehled použitých primerů:

Gen	Název	Sekvence	Citace
Flagellin	FlaF1A	AGCAAATTTAGGTGCTTTCCAA	Schwaiger et al. 2001
	FlaR1	GCAATCATTGCCATTGCAGA	
Flagellin sonda	FlaProbe1	TGCTACAACCTCATCTGTCATTGTAGC ATCTTTTATTG	Schwaiger et al. 2001

Tab. V: Složení qPCR reakce (20 μ l)

Luna Universal Probe qPCR MasterMix (NEB)	10 μ l
PCR voda	4 μ l
Primery (10 μ M)	0,8 + 0,8 μ l
Sonda (10 μ M)	0,4 μ l
DNA	4 μ l

Takto připravené vzorky byly vloženy do termocycleru Rotor-gene 6000 (Corbett Research), a následoval 45x opakovaný cyklus, který se skládal z:

1. Denaturace, 120 sekund, 95 °C
2. Nasedání primerů, 15 sekund, 95°C
3. Syntetizování DNA vláken, 30 sekund, 60 °C.

3.4.6 Stanovení proliferace a počtu T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie

Postup viz kapitola 2.3.7 a 2.3.8. Z praktických důvodů byla stanovení na průtokovém cytometru rozdělena na tři časově nezávislá měření. Data z jednotlivých měření byla následně normalizována vůči skupině ošetřené izotypovou kontrolou (Obr. 14, 15, 17, 18).

3.5 Statistická analýza

Všechny experimenty *in vitro* byly prováděny v biologických triplikátech a ve dvou nezávislých opakováních. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism verze X pomocí jednocestné analýzy variance a Šídákova *post-hoc* testu. Statisticky významné rozdíly jsou v grafech označeny hvězdičkami (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; ns = nesignifikatní). Hodnoty v grafech jsou vyneseny jako aritmetický průměr naměřených hodnot + střední chyba průměru (SEM).

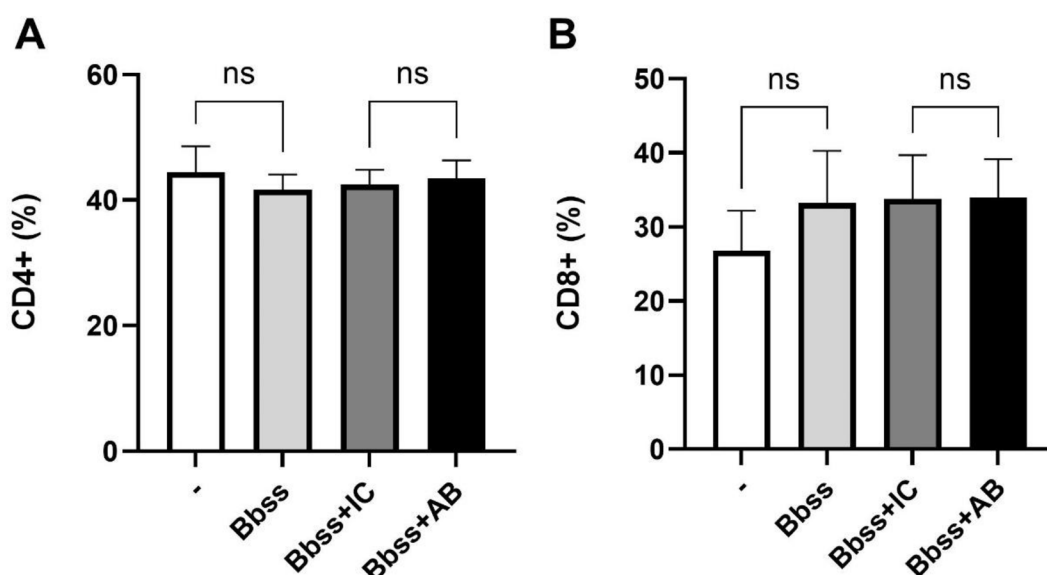
Statistické vyhodnocení *in vivo* experimentu bylo provedeno rovněž v programu Graphpad Prism verze X ($n = 8;10;10$), a to pomocí t-testu (Obr. 13), dvoucestné analýzy variance s Tukeyho *post-hoc* testem (Obr. 11, 20-23) a jednocestné analýzy variance s *post-hoc* testem dle Šídáka (Obr. 12, 14-19). Statisticky významné rozdíly jsou v grafech označeny hvězdičkami (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; ns = nesignifikatní). Hodnoty v grafech jsou vyneseny jako aritmetický průměr naměřených hodnot + střední chyba průměru (SEM) kromě Obr. 13, kde je vynesen geometrický průměr s geometrickou směrodatnou odchylkou.

4 Výsledky

4.1 Vliv anti-PD-L1 protilátky na T lymfocyty *in vitro*

V tomto experimentu byl sledovaný vliv neutralizační anti-PD-L1 protilátky s dvouhodinovou preinkubací na podíl subpopulací T lymfocytů po třech dnech kokultivace s plazmacytoidními dendritickými buňkami.

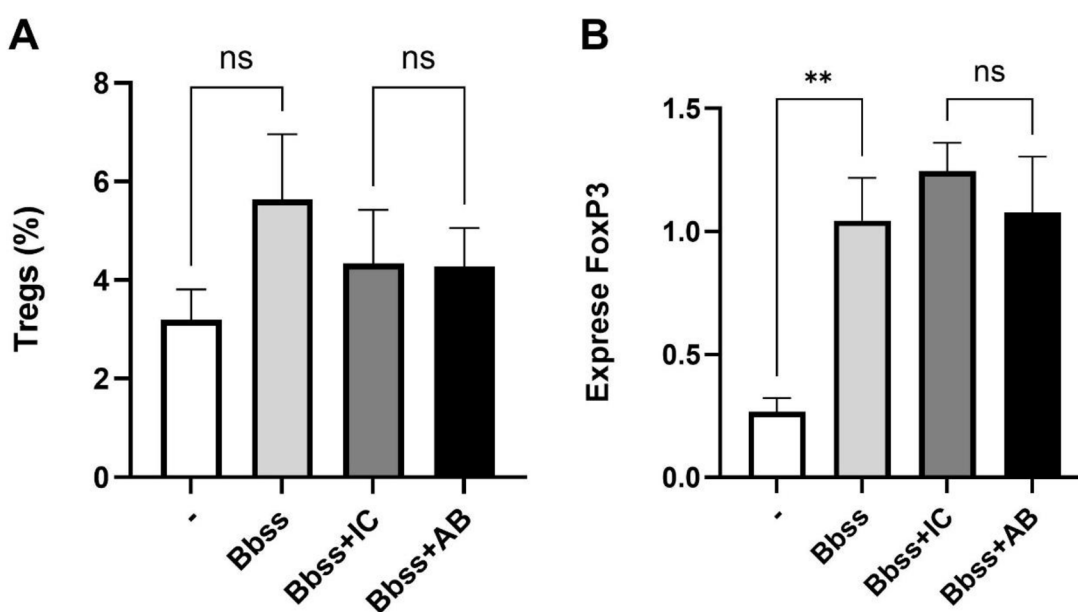
Indukce T lymfocytů byla nejprve sledována pomocí průtokového cytometru. Z obou grafů (Obr. 4A; 4B) je patrné, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou nijak neovlivnilo množství CD4+ a CD8+ T buněk. Dále můžeme pozorovat statisticky nesignifikantní zvýšení procenta CD8+ T buněk po aktivaci *B. burgdorferi* (Obr. 4B).



Obr. 4: Podíl CD4+ a CD8+ T buněk po 72 hodinách kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje změnu počtu CD4+ (A) a CD8+ (B) T buněk v procentech ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

Dále je znázorněno statisticky nesignifikantní zvýšení podílu regulačních T lymfocytů po přidání borelií vůči nestimulovaným buňkám (Obr. 5A). Ošetření anti-PD-L1 protilátkou neprokázalo významnou změnu v množství regulačních T lymfocytů vůči své izotypové kontrole.

Pro doplnění dat z průtokového cytometru byla sledována relativní exprese transkripčního faktoru FoxP3 pomocí real-time PCR (Obr. 5B). Stimulace boreliemi způsobila statisticky signifikantní zvýšení exprese FoxP3 oproti nestimulovaným buňkám. Buňky ošetřené neutralizační anti-PD-L1 protilátkou vykazují statisticky nesignifikantní snížení exprese FoxP3 vůči své izotypové kontrole.

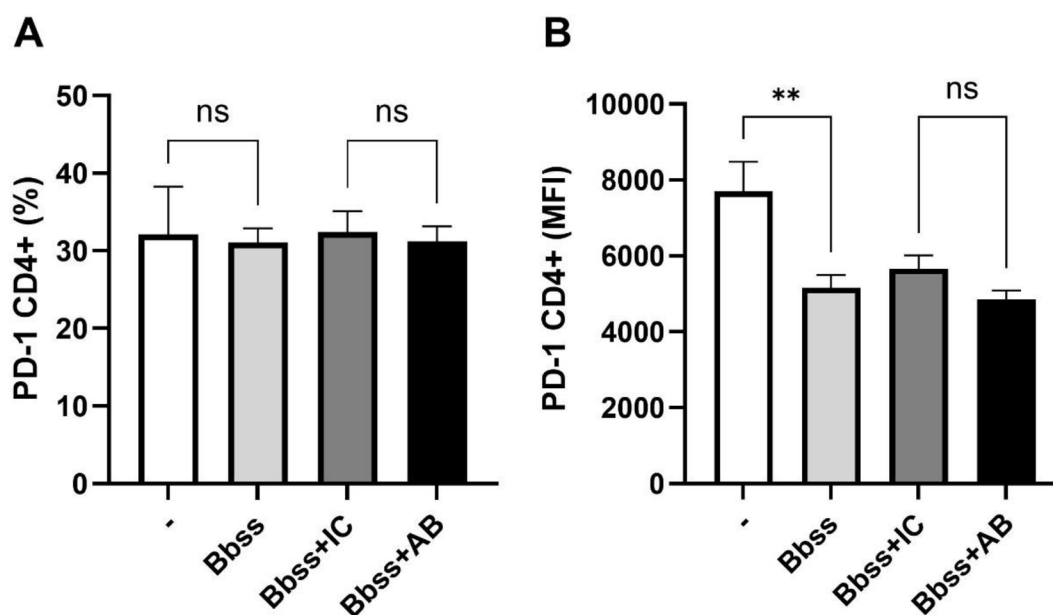


Obr. 5: Podíl regulačních T lymfocytů 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty a změnu relativní exprese genu pro FoxP3. Graf reprezentuje podíl regulačních T lymfocytů v procentech (A) a změnu relativní exprese transkripčního faktoru FoxP3 (B) po ošetření anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4.2 Exprese PD-1 receptoru na T lymfocytech po ošetření anti-PD-L1 protilátkou *in vitro*

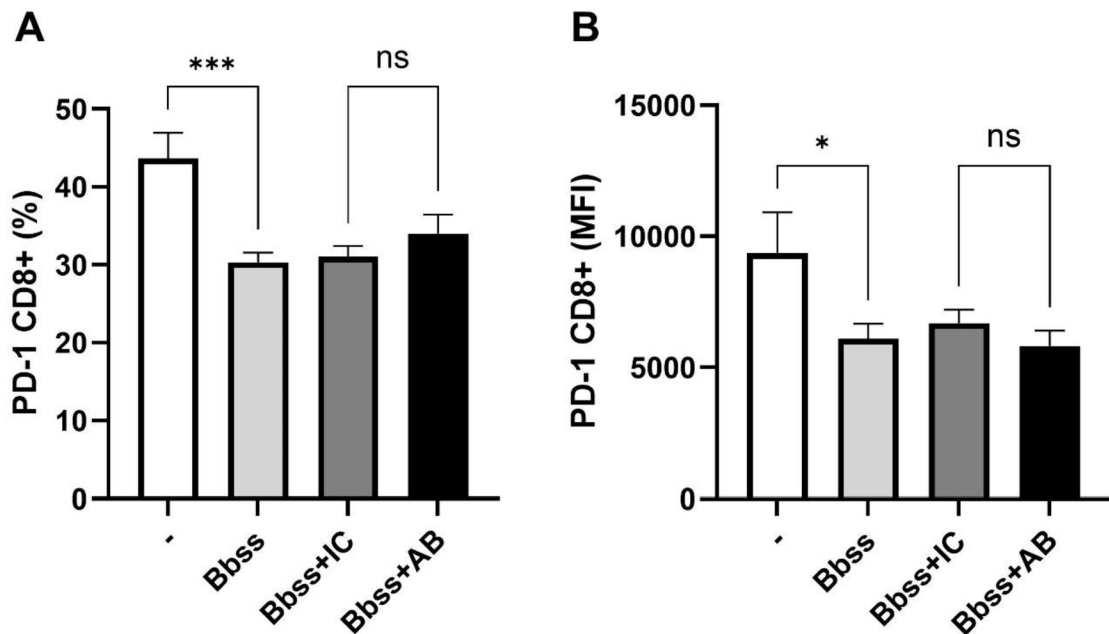
Cílem tohoto měření bylo zjistit vliv anti-PD-L1 protilátky s preinkubací 2 hodiny na změnu exprese PD-1 receptoru na CD8+ a CD4+ T lymfocytech 72 hodin od kokultivace s plazmacytoïdními dendritickými buňkami pomocí průtokového cytometru.

Na obrázku 6 je znázorněn podíl CD4+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor (Obr. 6A) a medián exprese PD-1 u těchto buněk (Obr. 6B). Ošetření anti-PD-L1 protilátkou nijak neovlivnilo podíl CD4+ T lymfocytů s PD-1 receptorem (Obr. 6A). Na druhou stranu je zřejmé statisticky signifikantní snížení exprese PD-1 na CD4+ T buňkách stimulovaných boreliemi vůči nestimulovaným buňkám (Obr. 6B). Dále lze z tohoto grafu vyčíst statisticky nevýznamné snížení exprese PD-1 u buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou oproti své izotypové kontrole.



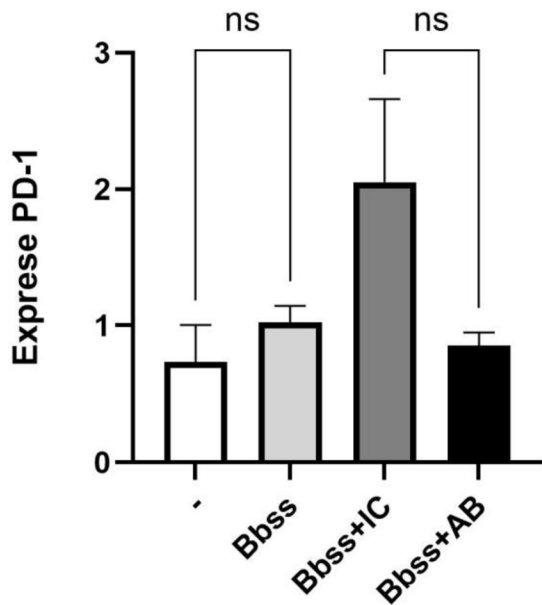
Obr. 6: Podíl CD4+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor a exprese PD-1 u CD4+ T lymfocytů 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje změnu počtu CD4+ T buněk nesoucí PD-1 receptor (A) a změnu exprese PD-1 u CD4+ T buněk (B) po ošetření anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

U CD8+ T buněk je v obou měřeních znázorněno statisticky signifikantní snížení PD-1 u boreliemi aktivovaných buněk vůči nestimulovaným buňkám (Obr. 7A; 7B). Ošetření protilátkou nemělo významný vliv na expresi PD-1.



Obr. 7: Podíl CD8+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor a exprese PD-1 u CD4+ T lymfocytů 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje změnu počtu CD4+ T buněk nesoucí PD-1 receptor (A) a změnu exprese PD-1 u CD8+ T buněk (B) po ošetření anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; * $p \leq 0,001$.**

Data naměřená z průtokového cytometru byla doplněna pomocí kvantitativní real-time PCR. Změna relativní exprese genu pro PD-1 byla statisticky nesignifikantně zvýšena boreliemi vůči nestimulovaným buňkám (Obr. 8). Dále je na grafu patrné statisticky nevýznamné snížení hladiny exprese u buněk s anti-PD-L1 protilátkou vůči izotypové kontrole.

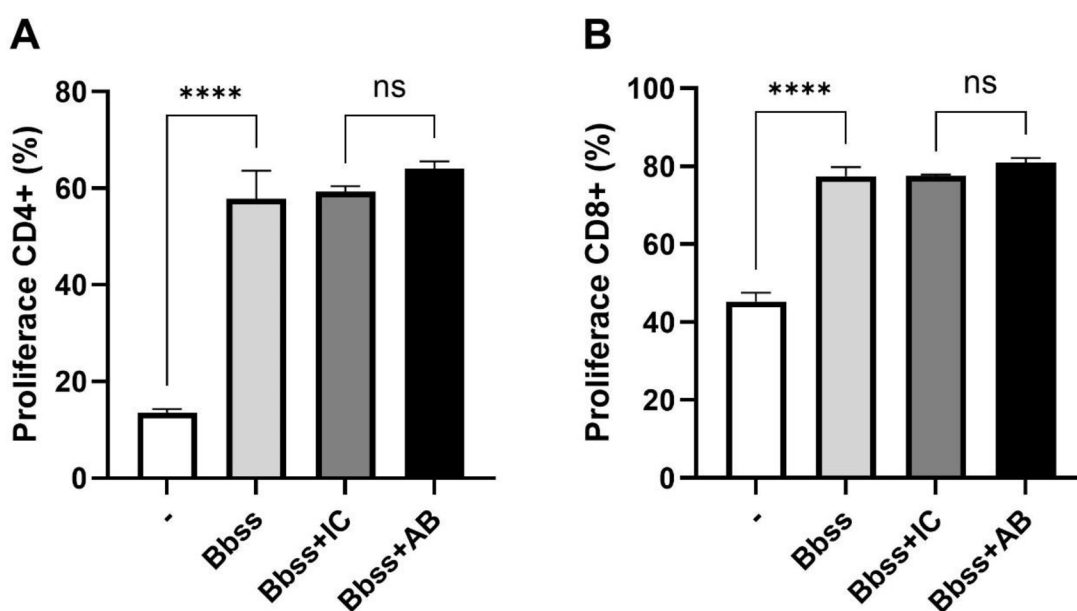


Obr. 8: Změna relativní exprese genu pro PD-1 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje změnu relativní exprese genu pro PD-1 po ošetření anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

4.3 Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci T lymfocytů *in vitro*

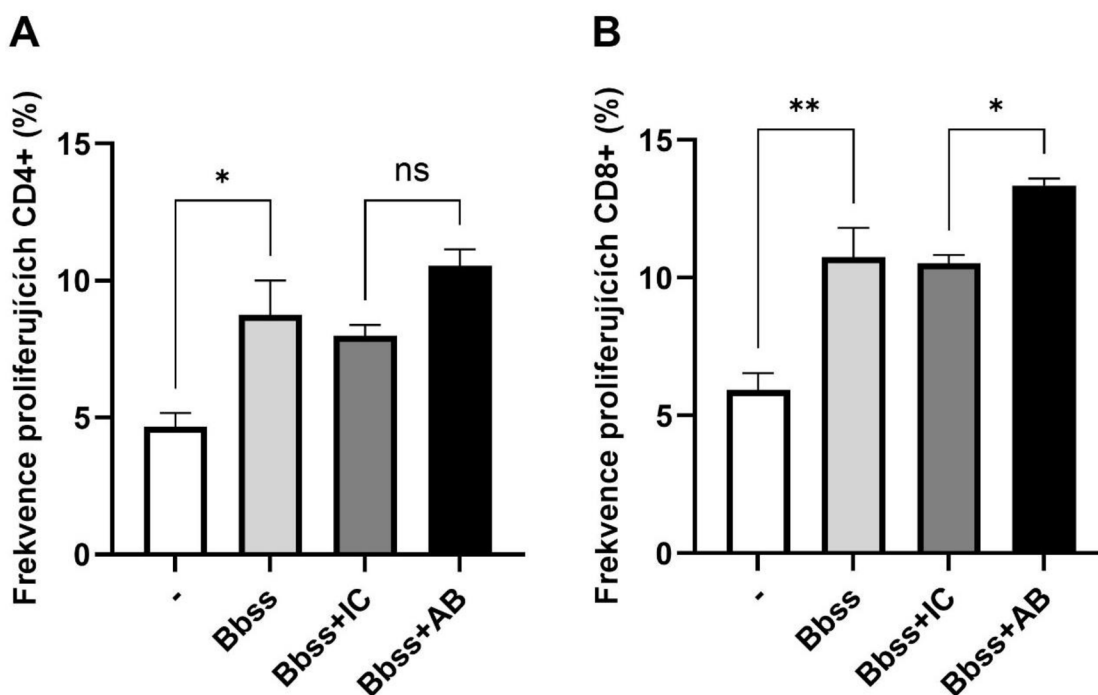
Cílem následujícího experimentu bylo zjistit, zda by bylo možné zvýšit proliferaci specifických T lymfocytů pomocí blokování vazby PD-1/PD-L1 anti-PD-L1 protilátkou aplikovanou dvě hodiny před přidáním T lymfocytů. Proliferace byla stanovena pomocí měření redistribuce cytoplasmaticky vázaného fluorochromu CTV pomocí průtokového cytometru po pěti dnech kokultivace T lymfocytů s plazmacytoidními dendritickými buňkami.

U skupiny grafů na obrázku 9 lze vyčíst, že buňky stimulované boreliemi mají statisticky signifikantně zvýšený podíl proliferační aktivity CD4+ a CD8+ T buněk vůči nestimulovaným buňkám (Obr. 9A; 9B), ovšem aplikace protilátky neměla na tento parametr významný vliv.



Obr. 9: Podíl proliferační aktivity CD4+ a CD8+ buněk 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje podíl proliferujících CD4+ T buněk (A) a CD8+ T buněk (B) ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: **** $p \leq 0,0001$; ns $p > 0,05$.

Software NovoExpress pro analýzu dat z průtokové cytometrie umožňuje stanovit různé parametry proliferace, jeden z nich je frekvence proliferujících T buněk, tj. podíl buněk z původní populace, které vykazaly proliferační aktivitu. V následujících dvou grafech (Obr. 10A; 10B) je znázorněné statisticky signifikantní zvýšení frekvence proliferujících CD4+ a CD8+ T lymfocytů u boreliemi stimulovaných buněk oproti nestimulovaným buňkám. Další statisticky signifikantní zvýšení lze vyčíst u ošetřených CD8+ T buněk neutralizační anti-PD-L1 protilátkou vůči buňkám s izotypovou kontrolou (Obr. 10B). Tento trend je stejný i u CD4+ T buněk, ale statisticky nesignifikantní (Obr. 10A).

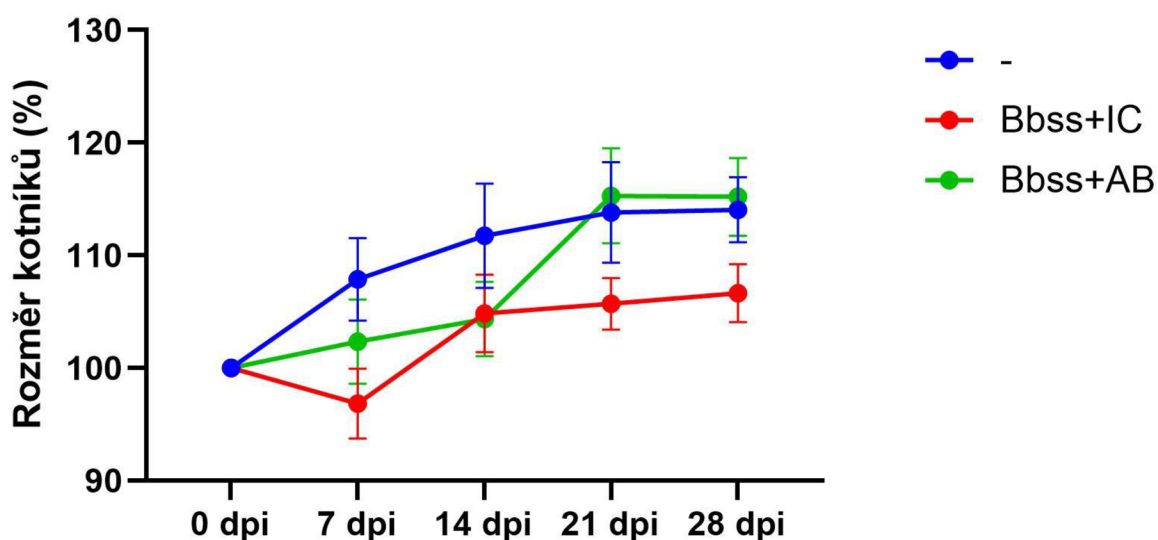


Obr. 10: Frekvence proliferujících CD4+ a CD8+ buněk 72 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje frekvenci proliferujících CD4+ T buněk (A) a CD8+ T buněk (B) ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC) s preinkubací 2 hodiny s pDC v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ns $p > 0,05$.

4.1 Vliv aplikace anti-PD-L1 protilátky na myši infikované *B. burgdorferi* *in vivo*

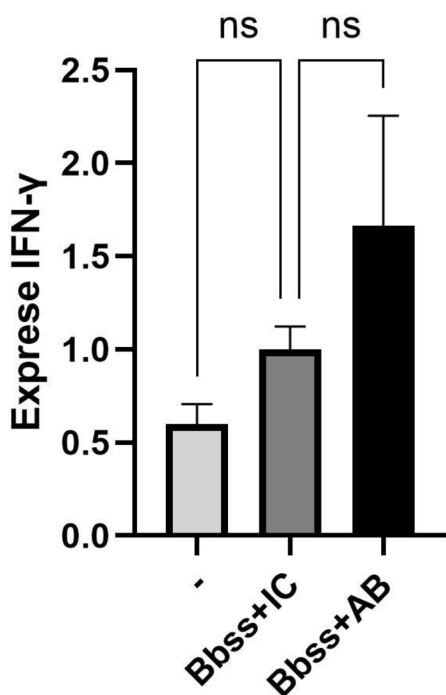
4.1.1 Vliv anti-PD-L1 protilátky na rozvoj artritidy *in vivo*

V tomto pokusu byla měřena tloušťka tibiotarzálního kloubu v pravidelných intervalech po sedmi dnech v souvislosti s možným rozvojem lymeské artritidy, jako odpověď na infekci vyvolanou *B. burgdorferi*. Výsledky byly vztaženy k rozměrům kloubů na začátku pokusu (0 dpi). Jak je znázorněno na obrázku 11, infikované myši, kterým byla podávána izotypová kontrola mají po celou dobu měření statisticky nesignifikantně menší rozměr kloubu než neinfikované myši. Vliv anti-PD-L1 protilátky na změnu velikosti tibiotarzálního kloubu zde nebyl zaznamenán.



Obr. 11: Tloušťka tibiotarzálního kloubu u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje opakované měření tibiotarzálního kloubu po sedmi dnech u infikovaných myši *B. burgdorferi* a ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

V myších kloubech byla dále sledovaná relativní exprese genu pro IFN- γ . Z grafu (Obr. 12) je patrné, že mezi infikovanou skupinou myši boreliemi, kterým byla podávána izotypová kontrola a neinfikovanými myši nebyl naměřen statisticky významný rozdíl. Tento trend byl stejný, ale statisticky nesignifikantní i u skupiny myši, kterým byla podávána anti-PD-L1 protilátka vůči skupině s izotypovou kontrolou.



Obr. 12: Změna relativní exprese genů pro IFN- γ u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje změnu relativní exprese genu pro IFN- γ infikovaných myši *B. burgdorferi* a ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

4.1.2 Detekce *B. burgdorferi* v myších tkáních ošetřených anti-PD-L1 protilátkou *in vivo*

V tomto experimentu bylo množství borelií v sledovaných orgánech nízké, proto výsledky byly vyhodnoceny kvalitativně na přítomnost borelií v myších orgánech (pozitivní), nebo nepřítomnost borelií v myších orgánech (negativní).

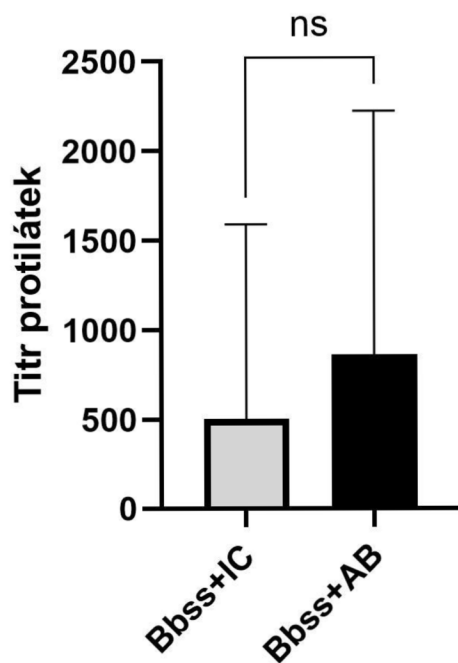
Z tabulky (Tab. VI) lze vyčíst, že celkový počet pozitivních myší na *B. burgdorferi* ošetřených anti-PD-L1 protilátkou je nižší (4/10), oproti skupině myší s izotypovou kontrolou (6/10). Infikovaná skupina myší boreliemi s izotypovou kontrolou měla celkem 11 infikovaných orgánů v porovnání se skupinou myší ošetřených anti-PD-L1 protilátkou, kde bylo jen 7 orgánů pozitivních na borelie. Toto snížení je zapříčiněno rozdílnou pozitivitou v močových měchýřích a kloubech mezi oběma skupinami.

Tab. VI: Kvalitativní stanovení borelií v myších orgánech

Tkáně pozitivní na *B. burgdorferi*

	IC	AB
Počet pozitivních myší	6/10	4/10
Počet pozitivních tkání	11/60	7/60
Kůže	2/10	3/10
Ucho	3/10	2/10
Močový měchýř	2/10	0/10
Srdce	0/10	0/10
Kloub	4/10	2/10

Z odebraných myších sér byl zjišťován titer protilátek proti boreliovému antigenu. Z grafu (Obr. 13) je vidět statisticky nesignifikantní zvýšení titru protilátek u myši ošetřené anti-PD-L1 protilátkou oproti myšim s izotypovou kontrolou.

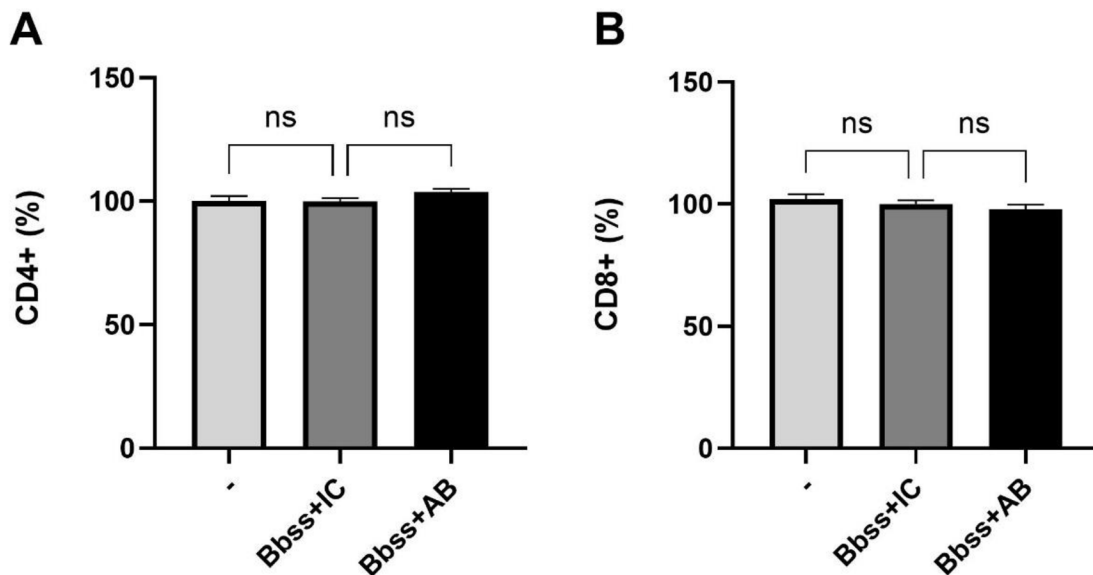


Obr. 13: Titr protilátek u infikovaných myši *B. burgdorferi* ošetřené anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Statistická analýza byla provedena pomocí T-testu. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

4.1.3 Vliv anti-PD-L1 protilátky na T lymfocyty *in vivo*

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit pomocí průtokového cytometru tvorbu myších T lymfocytů *in vivo* a vliv neutralizační anti-PD-L1 protilátky na jejich indukci při infekci *B. burgdorferi*.

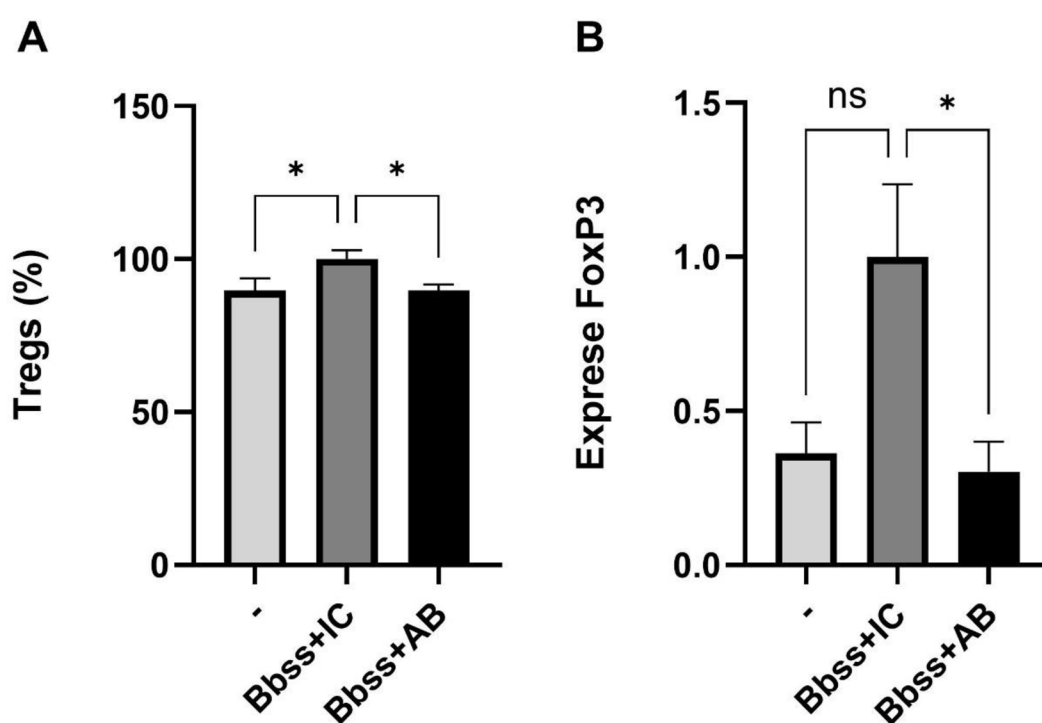
Z následujících grafů (Obr. 14A; 14B) vyplývá, že ošetření neutralizační anti-PD-L1 protilátkou nemělo vliv na množství CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů.



Obr. 14: Podíl CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů u myší ošetřenými anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou při infekci *B. burgdorferi*. Graf reprezentuje změnu počtu CD4⁺ T lymfocytů (A) a CD8⁺ T lymfocytů (B) v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

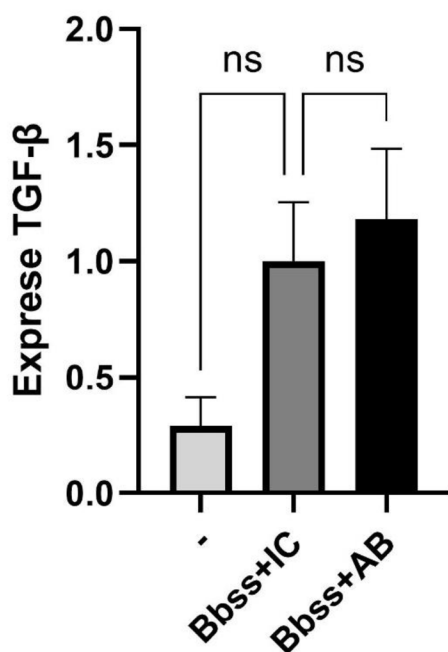
Dále byla pozorována indukce T regulačních lymfocytů. Z grafu (Obr. 15A) lze vyčíst, že infekce vytvořená *B. burgdorferi* statisticky signifikantně zvýšila podíl regulačních T lymfocytů, oproti neinfikované skupině myší. Dále u myší, které byly ošetřeny anti-PD-L1 protilátkou, je patrné statisticky signifikantní snížení Tregs ve srovnání se skupinou myší s izotypovou kontrolou.

Pro doplnění dat z průtokového cytometru byla sledována relativní exprese transkripčního faktoru FoxP3 pomocí real-time PCR (Obr. 15B). Aplikace neutralizační anti-PD-L1 protilátky infikovaným myším statisticky signifikantně snížila expresi genu pro FoxP3 oproti myším s izotypovou kontrolou.



Obr. 15: Podíl regulačních T lymfocytů a změna relativní exprese genu pro FoxP3 u myší ošetřenými anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou při infekci *B. burgdorferi*. Graf reprezentuje změnu počtu T regulačních lymfocytů v procentech (A) a změnu relativní exprese transkripčního faktoru FoxP3 (B) po ošetření anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: * $p \leq 0.05$

V následujícím grafu (Obr. 16) je znázorněná zvýšená statisticky nesignifikantní relativní exprese genů pro TGF- β u myši, kterým byla podávána izotypová kontrola, oproti neinfikovaným myším. Ošetření anti-PD-L1 protilátkou vedle k mírnému statisticky nesignifikantnímu zvýšení exprese genu pro TGF- β oproti skupině myši s izotypovou kontrolou.

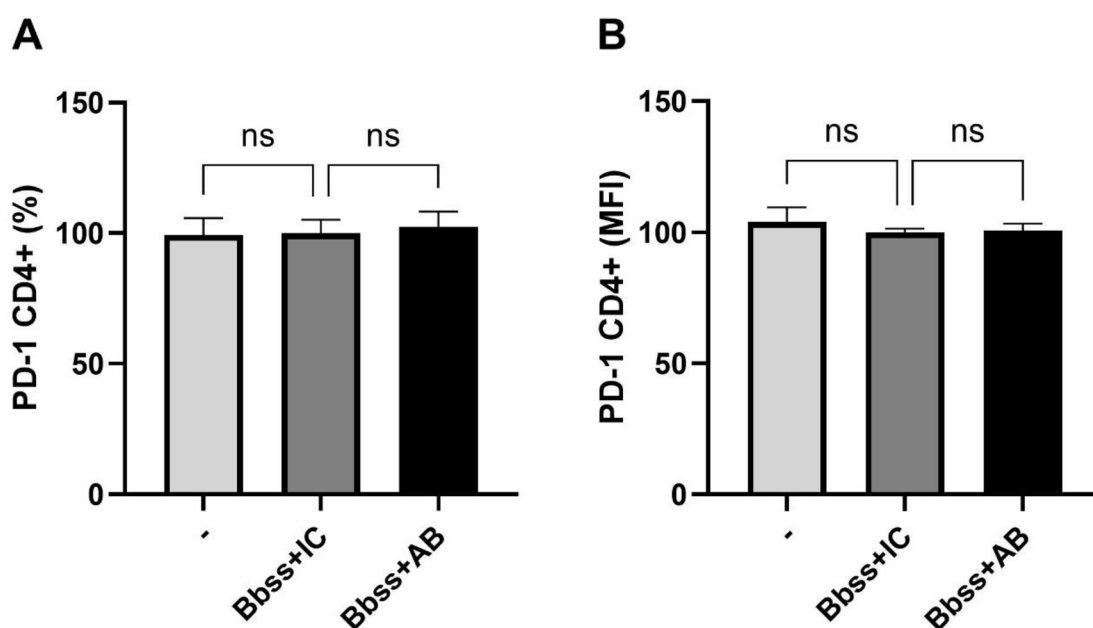


*Obr. 16: Změna relativní exprese genů pro TGF- β u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje změnu relativní exprese genu pro TGF- β infikovaných myši *B. burgdorferi* a ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.*

4.1.4 Změna exprese PD-1 receptoru na T lymfocytech po ošetření anti-PD-L1 protilátkou *in vivo*

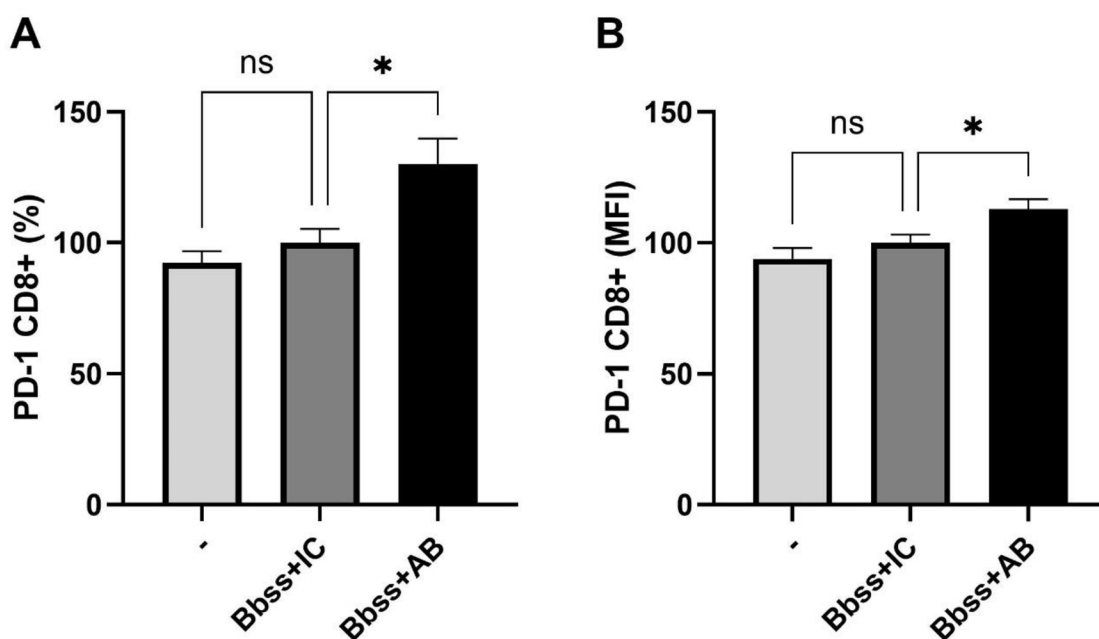
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv anti-PD-L1 protilátky na změnu exprese PD-1 receptoru na CD8+ a CD4+ T lymfocytech u myši infikovanými *B. burgdorferi* pomocí průtokového cytometru.

Z grafu (Obr. 17A; 17B) je patrné, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou nijak neovlivnilo podíl CD4+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor, ani jeho expresi.



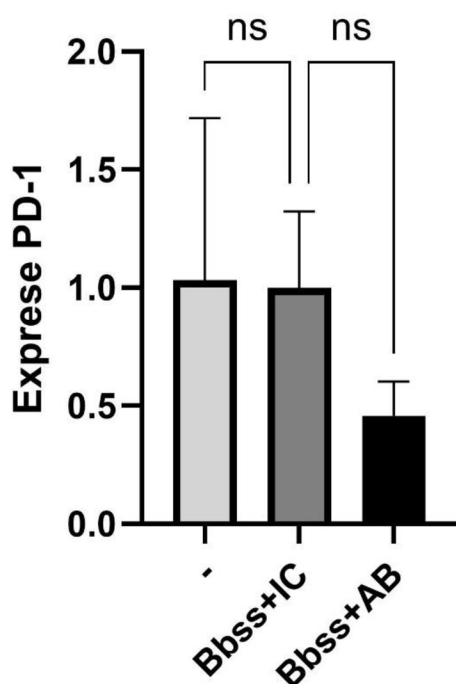
*Obr. 17: Podíl CD4+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor a exprese PD-1 u CD4+ T lymfocytů u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje změnu podílu CD4+ T buněk nesoucí PD-1 receptor (A) a změnu exprese PD-1 u CD4+ T buněk (B) infikovaných myši *B. burgdorferi* ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$*

U CD8+ T buněk (Obr. 18A; 18B) v obou případech vedlo ošetření anti-PD-L1 protilátkou ke statisticky signifikantnímu zvýšení oproti skupině ošetřené izotypovou kontrolou.



*Obr. 18: Podíl CD8+ T lymfocytů nesoucí PD-1 receptor a exprese PD-1 u CD8+ T lymfocytů u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje změnu podílu CD8+ T buněk nesoucí PD-1 receptor (A) a změnu exprese PD-1 u CD8+ T buněk (B) infikovaných myši B. burgdorferi ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$; * $p \leq 0.05$*

Data naměřená z průtokového cytometru byla doplněna kvantitativní real-time PCR. Změna relativní exprese genu pro PD-1 byla statisticky nesignifikantně snížena anti-PD-L1 protilátkou vůči myším s izotypovou kontrolou (Obr. 19).

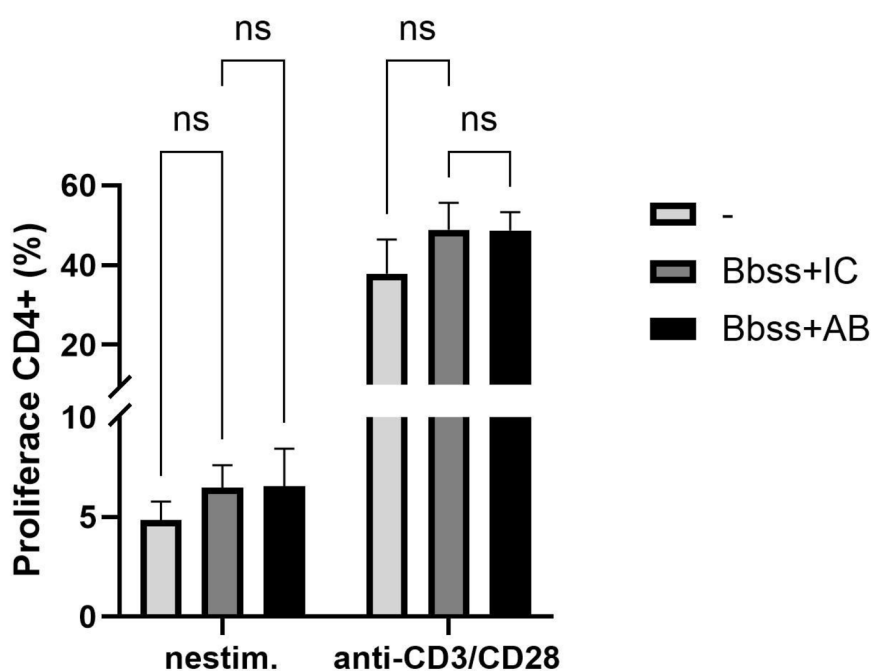


Obr. 19: Změna relativní exprese genu pro PD-1 u infikovaných myší ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje změnu relativní exprese genu pro PD-1 infikovaných myší B. burgdorferi a ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (AB) a její izotypovou kontrolou (IC). Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

4.1.5 Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci myších T lymfocytů *in vivo*

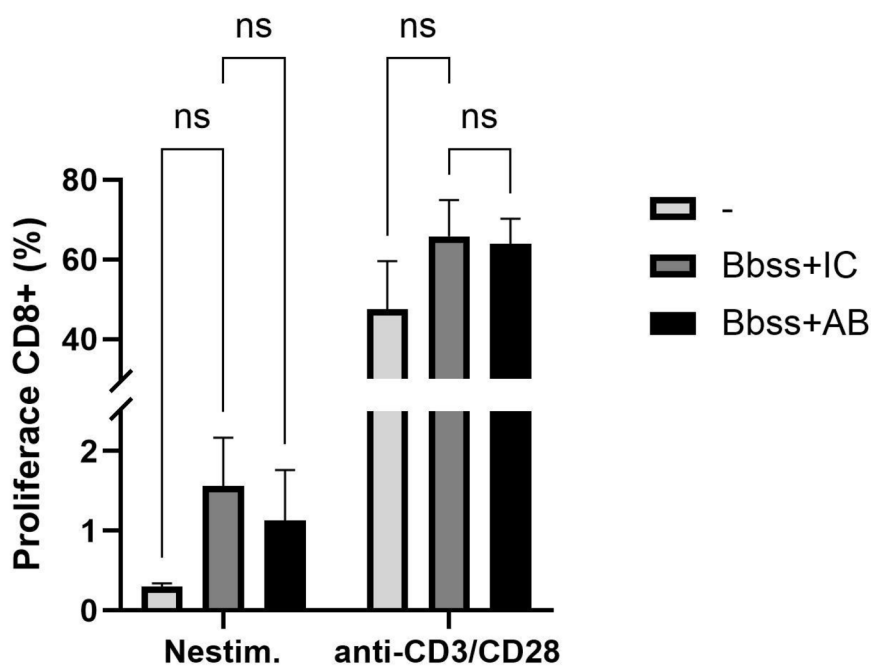
Cílem následujícího experimentu bylo zjistit, zda se zvýší proliferace specifických T lymfocytů pomocí blokování vazby PD-1/PD-L1 anti-PD-L1 protilátkou, která byla podávána myším ve třech pravidelných intervalech po třech dnech. U myších splenocytů byla provedena *ex vivo* restimulace pomocí anti-CD3/CD28 protilátek. Proliferace byla stanovena pomocí měření redistribuce cytoplasmaticky vázaného fluorochromu CTV pomocí průtokového cytometru.

Z grafu (Obr. 20) lze vyčíst aktuální podíl potomstva nestimulovaných a restimulovaných CD4⁺ T lymfocytů. V obou skupinách je vidět, že infikované myši s izotypovou kontrolou mají statisticky nesignifikantně zvýšenou proliferaci CD4⁺ T buněk oproti neinfikovaným myším. Vliv protilátky na proliferaci CD4⁺ T lymfocytů zde nebyl zaznamenán.



Obr. 20: Podíl potomstva proliferujících CD4⁺ T lymfocytů u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje nestimulované i restimulované CD4⁺ T lymfocyty u infikovaných myši *B. burgdorferi* v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: *ns* $p > 0,05$.

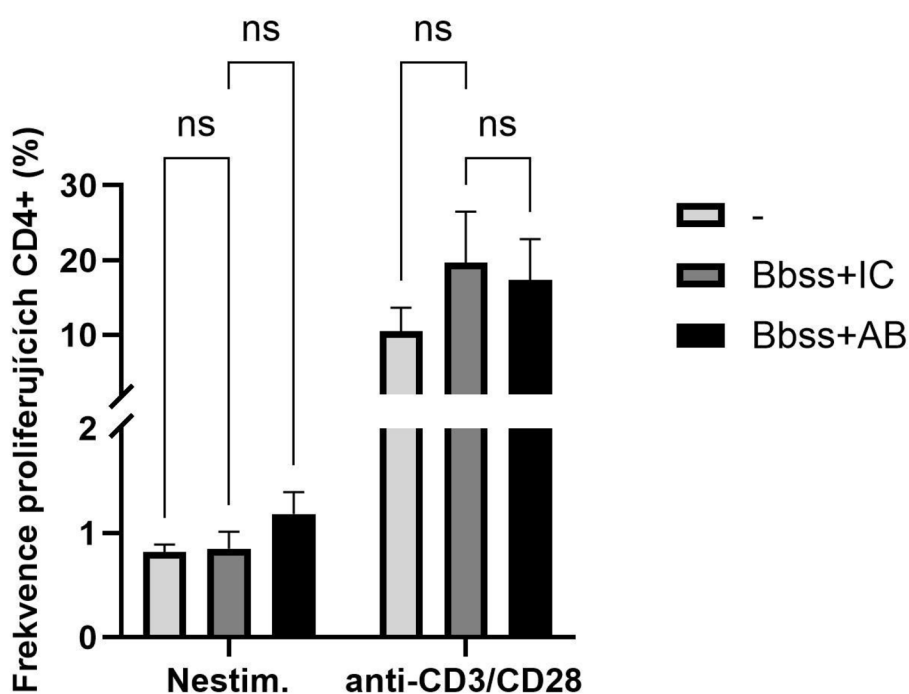
U potomstva prolifерujících CD8+ T lymfocytů (Obr. 21) je zvýšená proliferační aktivita u myši s izotypovou kontrolou oproti neinfikovaným myším. Dále ošetření anti-PD-L1 protilátkou vedlo k mírnému snížení prolifерujících nestimulovaných CD8+ T buněk. Tyto dva trendy byly stejné i u restimulovaných buněk. V obou případech tyto data byla statisticky nesignifikantní.



Obr. 21: Podíl potomstva prolifерujících CD8+ T lymfocytů u infikovaných myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje nestimulované i restimulované CD8+ T lymfocyty u infikovaných myši *B. burgdorferi* v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

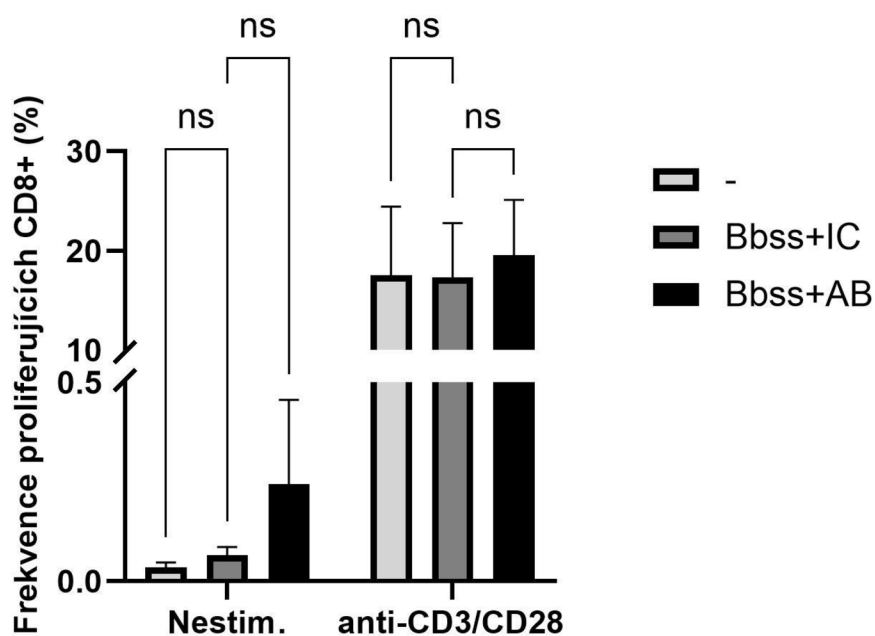
Software NovoExpress pro analýzu dat z průtokové cytometrie umožňuje stanovit různé parametry proliferace, jeden z nich je frekvence proliferujících T buněk, tj. podíl buněk z původní populace, které vykazovalo proliferační aktivitu (Obr. 22; 23).

U nestimulovaných CD4⁺ T myších buněk nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi neinfikovanou skupinou myši a myši s izotypovou kontrolou, na rozdíl u restimulovaných CD4⁺ T buněk, kde myši, kterým byla podávána izotypová kontrola vykazovaly statisticky nesignifikantní nárůst proliferujících buněk. Ošetření anti-PD-L1 protilátkou vedlo u nestimulovaných CD4⁺ T buněk k mírnému zvýšení podílu proliferujících buněk oproti izotypové kontrole. U restimulovaných buněk nebyl zaznamenán vliv anti-PD-L1 protilátky.



Obr. 22: *Frekvence proliferujících CD4⁺ T lymfocytů u myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje nestimulované i restimulované CD4⁺ T lymfocyty u infikovaných myši B. burgdorferi v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.*

U CD8+ T buněk (Obr. 23) ošetření anti-PD-L1 protilátkou u nestimulovaných buněk vedlo k mírnému statisticky nevýznamnému rozdílu oproti CD8+ T buňkám s izotypovou kontrolou. U restimulovaných CD8+ T buněk nebyl zaznamenán žádný vliv protilátky.



Obr. 23: Frekvence proliferujících CD8+ T lymfocytů u myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou a její izotypovou kontrolou. Graf reprezentuje nestimulované i restimulované CD8+ T lymfocyty u infikovaných myši *B. burgdorferi* v procentech. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: ns $p > 0,05$.

5 Diskuze

Lymeská borelióza (LD) se stala nejčastějším onemocněním přenášeným vektory na severní polokouli. Její původce, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, je schopen vyvolat v hostiteli perzistentní infekci i po léčbě antibiotiky, což vede ke stavu známému jako post-treatment Lyme disease syndrom (PTLDS). Aby spirochety *B. burgdorferi* mohly přetrvat v hostiteli, musí se vyhnout aktivovaným vrozeným i adaptivním imunitním reakcím (Anderson & Brissete, 2012). Jedním z mechanismů, kterými původci infekčních chorob unikají imunitnímu systému, jsou imunitní kontrolní body, které jsou zapojeny do inhibičních imunitních drah, které jsou klíčové pro udržení autotolerance. Jejich úkolem je regulovat délku imunitních reakcí s cílem minimalizovat poškození tkáně (Pardoll, 2012).

V této diplomové práci byla zkoumána role kontrolní osy PD-1/PD-L1 na imunitní odpověď při infekci *B. burgdorferi* v myším modelovém systému *in vitro* a *in vivo*. Dosažené výsledky poskytují poznatky ohledně účinku zablokování této osy neutralizační anti-PD-L1 protilátkou na imunitní odpověď na tuto bakteriální infekci.

Z předchozích studií v naší laboratoři je známo, že borelie indukují PD-L1 u myších dendritických buněk a že *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen ATCC® 35211TM) indukovaly vyšší povrchovou expresi aktivačního markeru CD86, inhibičního receptoru PD-L1 a protizánětlivého cytokinu IL-10 než *B. afzelii* CB43, proto byly vybrány jako nejvhodnější model boreliemi navozené imunosuprese. Dále z předchozích pokusů byl patrný trend ve snížení IL-2 a TGF- β po ošetření buněk protilátkou, který mohl znamenat snížení přítomnosti Tregs (Palounková, 2022).

Dráha PD-1/PD-L1 se využívá v posledních letech jako terapeutický cíl v léčbě imunopatologických stavů, včetně několika typů nádorových onemocnění, kde zablokování osy PD-1/PD-L1 monoklonálními protilátkami posílilo imunitní odpověď pacienta a vedlo k efektivnější eliminaci patologických buněk. Kostimulační receptor PD-1 a jeho ligand PD-L1 jsou klíčovými faktory v regulaci aktivace T lymfocytů. Jejich interakce spouští koinhibiční signál, který může vést k apoptóze T buněk, autotoleranci, nebo jejich funkčnímu vyčerpání (Shi et al., 2013; Diggs & Hsueh, 2017). Proto první experimenty byly zaměřeny na vliv anti-PD-L1 protilátky na imunitní odpověď T lymfocytů *in vitro* při aktivaci plazmacytoidními dendritickými buňkami (pDC) pomocí *B. burgdorferi*. V rámci

experimentů jsme sledovali změny v podílu subpopulací T lymfocytů, expresi PD-1 receptoru a proliferační aktivitu T buněk.

I když ovlivnění množství celkových CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů neutralizační anti-PD-L1 protilátkou nebylo *in vitro* prokázáno, podíl regulačních T lymfocytů byl nesignifikantně zvýšen u buněk aktivovaných boreliemi vůči nestimulovaným buňkám. Tento trend byl stejný i na úrovni exprese transkripčního faktoru FoxP3, ale také statisticky nesignifikantní. *Borrelia burgdorferi* indukují Tregs u pacientů s lymeskou boreliózou, kdy tito pacienti mají signifikantně zvýšený počet Tregs ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých pacientů (Kisand et al., 2007). Rovněž Jarefors a kol. pozorovali u pacientů s lymeskou boreliózou vyšší hladinu FoxP3 než u zdravých jedinců (Jarefors et al., 2007). Ošetření anti-PD-L1 protilátkou snížilo expresi genů pro FoxP3, i když statisticky nevýznamně. Studie Zenga a kol. uvádí, že potlačení efektorových odpovědí T buněk je z velké části zprostředkováno regulačními T lymfocyty (Zeng et al., 2020). Ve zvoleném experimentálním uspořádání *in vitro* se však nepodařilo prokázat vliv protilátky na regulační T lymfocyty.

Dále byla sledována exprese receptoru PD-1. U CD8⁺ T buněk bylo pozorováno statisticky signifikantní snížení PD-1 u boreliemi aktivovaných buněk vůči nestimulovaným buňkám. Při akutní infekci je PD-1 indukován za méně než 24 hodin po aktivaci T buněk zprostředkované TCR a jeho exprese klesá s tzv. clearance antigenu (Jubel et al., 2020). Je proto možné, že ve sledovaném čase 72 kokultivace pDC s T lymfocyty již došlo vlivem borelií ke snížení exprese tohoto markeru. Nicméně, ošetření anti-PD-L1 protilátkou nevedlo k významnému ovlivnění exprese PD-1 na těchto buňkách.

Proliferační aktivita byla stanovena pomocí proliferačního barviva Cell Trace Violet excitovaného fialovým laserem a funkcí výpočtu proliferačních indexů pomocí software NovoExpress. *Borrelia burgdorferi* aktivuje CD4⁺ T lymfocyty v sekundárních lymfatických orgánech (Hammond & Baumgarth, 2022), což je ve shodě s výsledky v této diplomové práci, že stimulace *B. burgdorferi* vede ke statisticky signifikantnímu zvýšení proliferační aktivity u CD4⁺ a CD8⁺ T buněk. Hlavní sledovaný proliferační index byl v této diplomové práci frekvence proliferačních T buněk., tj. podíl buněk z původní populace, které vykazaly proliferační aktivitu. I zde infekce boreliemi statisticky signifikantně zvýšila proliferační aktivitu CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. CD4⁺ T buňky mohou stimulovat B lymfocyty k tvorbě protilátek proti *B. burgdorferi* a tím hrát důležitou roli v imunitní obraně proti spirochetám. Proto by podpora indukce CD4⁺ T buněk mohla zamezit perzistenci *B. burgdorferi*

(Elsner et al., 2015; Hammond & Baumgarth, 2022). Dále díky ošetření anti-PD-L1 protilátkou se statisticky významně zvýšila i proliferační aktivita CD8⁺ buněk; tento trend byl podobný i v mé bakalářské práci, ale statisticky nesignifikantní. Vlivem anti-PD-L1 protilátky se v předcházejících experimentech zvýšil podíl prolifерujících CD4⁺ T buněk (Palounková, 2022). Ve studii Blackburnové a kol. bylo zjištěno, že blokování osy PD-1/PD-L1 vedlo ke zvrácení vyčerpání T buněk a zvýšení proliferace CD8⁺ T buněk u virové infekce (Blackburn et al., 2009).

V návaznosti na výsledky *in vitro* experimentů bylo rozhodnuto sledovat a porovnat výše zmíněné parametry doplněné o diseminaci borelií v myších tkáních a rozvoj lymeské artritidy v kloubech u myši infikovaných *B. burgdorferi* ošetřených anti-PD-L1 protilátkou *in vivo* a *ex vivo*.

V rámci úvodních měření bylo zjištěno, že aplikace anti-PD-L1 protilátky neměla vliv na změnu velikosti tibiotarzálního kloubu a rozvoj lymeské artritidy u infikovaných myši *B. burgdorferi*. Příčinou může být fakt, že myši kmene C57BL/6 jsou obecně méně náchylné k lymeské artritidě ve srovnání s myši kmene C3H. IFN- γ je jedním z důležitých faktorů pro vznik lymeské artritidy u myši (Helble et al., 2022). Nicméně analýza genové exprese v kloubech pokusných myši ukázala, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou statisticky nevýznamně zvýšilo expresi genu pro IFN- γ u infikovaných myši. I když jsme na makroskopické úrovni (otok kloubu) neprokázali žádný vliv aplikace protilátky na klouby, v dalších experimentech by bylo přínosné vyhodnocovat zánět kloubů histologicky a případně sledovat expresi dalších artritogenních faktorů, např. CXCL9 a CXCL10 (Whiteside et al., 2018). Je zajímavé, že u pacientů užívajících anti-PD-1 nebo anti-PD-L1 inhibitory imunitních kontrolních bodů k léčbě nádorového onemocnění se spontánně rozvine revmatoidní artritida, což naznačuje, že tyto imunitní kontrolní body hrají roli v rozvoji zánětu kloubů. Nicméně funkce PD-1/PD-L1 v rozvoji lymeské artritidy u lidských pacientů zůstává zatím neznámá (Helble et al., 2022).

Dalším výsledkem bylo snížení množství *B. burgdorferi* v myších tkáních ošetřených anti-PD-L1 protilátkou. Tento efekt byl nejvýraznější v močovém měchýři a kloubech. To může naznačovat, že blokáda osy PD-1/PD-L1 může přispívat k ovlivnění bakteriální infekce a snižování počtu patogenů v tkáních, což může být zapříčiněno vyšší infiltrací T buněk do infikovaných tkání. Některé studie ukazují, že adaptivní přenos CD4⁺ T buněk produkujících IFN- γ do myši s deficitem T buněk a infikovaných *B. burgdorferi* zmírní

příznaky karditidy (Elsner et al., 2015). Následně z odebraných myších sér byla poté provedena ELISA s cílem určit titr protilátek proti boreliovému antigenu. Získané výsledky ukazují, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou statisticky nevýznamně zvýšilo titr protilátek ve srovnání s myšmi ošetřenými izotypovou kontrolou. Tento očekávaný výsledek je v souladu s našimi předchozími poznatky, které naznačují, že blokáda PD-1/PD-L1 osy anti-PD-L1 protilátkou aktivuje T buňky, jak bylo demonstrováno v této diplomové práci, a navíc může ovlivňovat B buňky. Tento efekt je způsoben přítomností PD-1 receptoru na B buňkách, kde také slouží jako inhibiční signál (Thibult et al., 2013). Výsledek ohledně titru protilátek je zde nicméně neprůkazný.

Dále byl sledován vliv anti-PD-L1 protilátky na množství T lymfocytů u myši během infekce *B. burgdorferi ex vivo*. Z výsledků vyplývá, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou nemělo signifikantní vliv na celkové množství CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů u myši infikovaných *B. burgdorferi*. Nicméně bylo pozorováno, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou vedlo ke statisticky signifikantnímu snížení podílu Tregs ve srovnání s izotypovou kontrolou. Tento výsledek byl podpořen také analýzou exprese transkripčního faktoru FoxP3, který je charakteristický pro Tregs. Je známo, že osa PD-1/PD-L1 ovlivňuje signální dráhy důležité pro vývoj a funkci regulačních T lymfocytů (Cai et al., 2019). Námi získaná data tedy v souladu s výše zmíněným naznačují, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou ovlivňuje regulaci Tregs během infekce *B. burgdorferi*. Dále bylo popsáno, že Tregs v místě nádoru potlačuje produkci TGF- β a IL-10 aktivitu zmíněných efektorových T buněk a APC proti rakovinným buňkám (Zeng et al., 2020). V našem případě infekce spirochetami způsobila mírné statisticky nevýznamné zvýšení exprese TGF- β . Jelikož v tomto *ex vivo* experimentálním modelu byly využity celé splenocyty, nemusí tato vyšší hladina exprese genu pro TGF- β být indukována jen pomocí Tregs. Například experimenty s myšimi modely ukázaly, že TGF- β produkovaný dendritickými buňkami je důležitým mediátorem v expanzi Tregs a hraje klíčovou roli v imunitní toleranci a perzistenci infekce *H. pylori* (Owyang et al., 2020).

Dále byl sledován vliv anti-PD-L1 protilátky na expresi PD-1 receptoru. U CD8⁺ T buněk bylo pozorované statisticky významné zvýšení podílu těchto buněk nesoucích PD-1 receptor u myši ošetřených anti-PD-L1 protilátkou ve srovnání s izotypovou kontrolou, což může souviset s tím, že hlavní funkcí molekuly PD-1 není vyčerpání T buněk, ale jedná se o marker jejich aktivace (Sharpe & Pauken, 2018). Tento trend byl na genové úrovni opačný, což může být zapříčiněno tím, že myší RNA byla izolována z celých splenocytů.

Nakonec byl zkoumán vliv zablokování osy PD-1/PD-L1 pomocí anti-PD-L1 protilátky na proliferaci specifických T lymfocytů u myši infikovaných *B. burgdorferi*. Výsledky naznačují, že ošetření anti-PD-L1 protilátkou nemělo ve zvoleném experimentálním uspořádání významný vliv na proliferaci slezinných CD4+ ani CD8+ T lymfocytů získaných z myši 28 dní po infekci.

Celkově vzato však dosažené výsledky naznačují, že blokáda osy PD-1/PD-L1 může ovlivnit imunitní odpověď během lymeské boreliózy a přispět k redukci množství spirochet *B. burgdorferi* v myších tkáních.

6 Shrnutí

- *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen ATCC® 35211TM) po interakci pDC s primovanými T lymfocyty statisticky významně:
 1. zvyšují expresi genu FoxP3 *in vitro* a podíl Tregs *in vivo*
 2. snižují expresi PD-1 na CD4+ a CD8+ T lymfocytech *in vitro*
 3. zvyšují proliferační aktivitu CD4+ a CD8+ T lymfocytů *in vitro*
- Zablokování osy PD-1/PD-L1 pomocí neutralizační anti-PD-L1 protilátky v myším modelovém systému způsobuje statisticky významné:
 1. zvýšení proliferační aktivity CD8+ T lymfocytů *in vitro*
 2. snížení podílu Tregs a exprese genu pro FoxP3 *in vivo*
 3. zvýšení exprese PD-1 u CD8+ T lymfocytů *in vivo*
- I když ošetření anti-PD-L1 protilátkou nemá v daném experimentálním uspořádání vliv na změnu velikosti tibiotarzálního kloubu a rozvoj lymeské artritidy u myší infikovaných *B. burgdorferi*, dochází ke snížení množství *B. burgdorferi* v myších tkáních, zejména v močovém měchýři a kloubech.

7 Reference

1. **Ahmed, H., Mahmud, A. R., Siddiquee, M. F., Shahriar, A., Biswas, P., Shimul, M. E. K., Ahmed, S. Z., Ema, T. I., Rahman, N., Khan, M. A., Mizan, M. F. R., & Emran, T. B.** (2022). Role of T cells in cancer immunotherapy: Opportunities and challenges. *Cancer pathogenesis and therapy*, 1(2), 116–126.
2. **Anderson, C., & Brissette, C. A.** (2021). The Brilliance of Borrelia: Mechanisms of Host Immune Evasion by Lyme Disease-Causing Spirochetes. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(3), 281.
3. **Arvikar, S. L., & Steere, A. C.** (2022). Lyme Arthritis. *Infectious disease clinics of North America*, 36(3), 563–577.
4. **Berndtson K.** (2013). Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *International journal of general medicine*, 6, 291–306.
5. **Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A., & Wherry, E. J.** (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology*, 10(1), 29–37.
6. **Branda, J. A., & Steere, A. C.** (2021). Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00018-19.
7. **Brissette, C. A., & Gaultney, R. A.** (2014). That's my story, and I'm sticking to it--an update on *B. burgdorferi* adhesins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 41.
8. **Cai, J., Wang, D., Zhang, G., & Guo, X.** (2019). The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *OncoTargets and therapy*, 12, 8437–8445.
9. **Diggs, L. P., & Hsueh, E. C.** (2017). Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomarker research*, 5, 12.
10. **Duan, X., Gao, S., Li, J., Wu, L., Zhang, Y., Li, W., Zhao, L., Chen, J., Yang, S., Sun, G., & Li, B.** (2017). Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4+ T cell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK, NF-kB, and Nrf2. *Molecular immunology*, 81, 160–172.
11. **Dulipati, V., Meri, S., & Panelius, J.** (2020). Complement evasion strategies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *FEBS letters*, 594(16), 2645–2656.
12. **Dyck, L., & Mills, K.** (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European journal of immunology*, 47(5), 765–779.

13. **Elsner, R. A., Haste, C. J., & Baumgarth, N.** (2015). CD4+ T cells promote antibody production but not sustained affinity maturation during *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection and immunity*, 83(1), 48–56.
14. **Foor, S. D., Brangulis, K., Shakya, A. K., Rana, V. S., Bista, S., Kitsou, C., Ronzetti, M., Alreja, A. B., Linden, S. B., Altieri, A. S., Baljinnam, B., Akopjana, I., Nelson, D. C., Simeonov, A., Herzberg, O., Caimano, M. J., & Pal, U.** (2023). A unique borrelial protein facilitates microbial immune evasion. *mBio*, 14(5), e0213523.
15. **Gade, A., Matin, T., Rubenstein, R., & Robinson, C. A.** (2023). Acrodermatitis Chronica Atrophicans. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
16. **Garcia-Monco, J. C., & Benach, J. L.** (2019). Lyme Neuroborreliosis: Clinical Outcomes, Controversy, Pathogenesis, and Polymicrobial Infections. *Annals of neurology*, 85(1), 21–31.
17. **Grabe, N., Lichtman, A. H., & Padera, R.** (2019). T cell checkpoint regulators in the heart. *Cardiovascular research*, 115(5), 869–877.
18. **Guérin, M., Shawky, M., Zedan, A., Octave, S., Avalle, B., Maffucci, I., & Padiolleau-Lefèvre, S.** (2023). Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC microbiology*, 23(1), 204.
19. **Hammond, E. M., & Baumgarth, N.** (2022). CD4 T cell responses in persistent *Borrelia burgdorferi* infection. *Current opinion in immunology*, 77, 102187.
20. **Han, J. H., Suh, C. H., Jung, J. Y., Ahn, M. H., Han, M. H., Kwon, J. E., Yim, H., & Kim, H. A.** (2017). Elevated circulating levels of the interferon- γ -induced chemokines are associated with disease activity and cutaneous manifestations in adult-onset Still's disease. *Scientific reports*, 7, 46652.
21. **Helble, J. D., McCarthy, J. E., Sawden, M., Starnbach, M. N., & Hu, L. T.** (2022). The PD-1/PD-L1 pathway is induced during *Borrelia burgdorferi* infection and inhibits T cell joint infiltration without compromising bacterial clearance. *PLoS pathogens*, 18(10), e1010903.
22. **Hepner, S., Fingerle, V., Duscher, G. G., Felsberger, G., Marosevic, D., Rollins, R. E., Okeyo, M., Sing, A., & Margos, G.** (2020). Population structure of *Borrelia turcica* from Greece and Turkey. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 77, 104050.

23. **Hernández, S. A., Ogrinc, K., Korva, M., Kastrin, A., Bogovič, P., Rojko, T., Kelley, K. W., Weis, J. J., Strle, F., & Strle, K.** (2023). Association of Persistent Symptoms after Lyme Neuroborreliosis and Increased Levels of Interferon- α in Blood. *Emerging infectious diseases*, 29(6), 1091–1101.
24. **Charon, N. W., & Goldstein, S. F.** (2002). Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual review of genetics*, 36, 47–73.
25. **Chen, Y., Guo, D. Z., Zhu, C. L., Ren, S. C., Sun, C. Y., Wang, Y., & Wang, J. F.** (2023). The implication of targeting PD-1:PD-L1 pathway in treating sepsis through immunostimulatory and anti-inflammatory pathways. *Frontiers in immunology*, 14, 1323797.
26. **Chung Y, Zhang N, Wooten RM** (2013) *Borrelia burgdorferi* Elicited-IL-10 Suppresses the Production of Inflammatory Mediators, Phagocytosis, and Expression of Co-Stimulatory Receptors by Murine Macrophages and/or Dendritic Cells. *PLOS ONE* 8(12): e84980.
27. **Jarefors, S., Janefjord, C. K., Forsberg, P., Jenmalm, M. C., & Ekerfelt, C.** (2007). Decreased up-regulation of the interleukin-12Rbeta2-chain and interferon-gamma secretion and increased number of forkhead box P3-expressing cells in patients with a history of chronic Lyme borreliosis compared with asymptomatic *Borrelia*-exposed individuals. *Clinical and experimental immunology*, 147(1), 18–27.
28. **Jubel, J. M., Barbati, Z. R., Burger, C., Wirtz, D. C., & Schildberg, F. A.** (2020). The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 487.
29. **Kisand, K. E., Prükk, T., Kisand, K. V., Lüüs, S. M., Kalbe, I., & Uibo, R.** (2007). Propensity to excessive proinflammatory response in chronic Lyme borreliosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115(2), 134–141.
30. **Kneubehl, A. R., & Lopez, J. E.** (2023). Comparative genomics analysis of three conserved plasmid families in the Western Hemisphere soft tick-borne relapsing fever borreliae provides insight into variation in genome structure and antigenic variation systems. *Microbiology spectrum*, 11(5), e0089523. Advance online publication.
31. **Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F. A., Bower, M., & Pinato, D. J.** (2018). PD-L1. *Journal of clinical pathology*, 71(3), 189–194.
32. **Lazarus, J. J., Kay, M. A., McCarter, A. L., & Wooten, R. M.** (2008). Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infection and Immunity*, 76(3), 1153–1162.

33. **Li, K., Chen, Y., Lin, Y., Zhang, G., Su, J., Wu, X., Cheng, C., Wang, Y., Yu, B., & Zhang, X.** (2023). PD-1/PD-L1 blockade is a potent adjuvant in treatment of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 31(1), 174–192.
34. **Liu, X., Yang, L., & Tan, X.** (2023). PD-1/PD-L1 pathway: A double-edged sword in periodontitis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 159, 114215.
35. **Lu, P., Youngblood, B. A., Austin, J. W., Mohammed, A. U., Butler, R., Ahmed, R., & Boss, J. M.** (2014). Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection. *The Journal of experimental medicine*, 211(3), 515–527. <https://doi.org/10.1084/jem.20130208>
36. **Mahajan V. K.** (2023). Lyme Disease: An Overview. *Indian dermatology online journal*, 14(5), 594–604.
37. **Margos, G., Fingerle, V., Cutler, S., Gofton, A., Stevenson, B., & Estrada-Peña, A.** (2020). Controversies in bacterial taxonomy: The example of the genus *Borrelia*. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(2)
38. **Margos, G., Gofton, A., Wibberg, D., Dangel, A., Marosevic, D., Loh, S. M., Oskam, C., & Fingerle, V.** (2018). The genus *Borrelia* reloaded. *PloS one*, 13(12), e0208432.
39. **Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H., & Fish, D.** (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(7), 1545–1563.
40. **Mason, L. M. K., & Hovius, J. W. R.** (2018). Investigating Human Dendritic Cell Immune Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1690, 291–299.
41. **Mason, L. M., Veerman, C. C., Geijtenbeek, T. B., & Hovius, J. W.** (2014). Ménage à trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends in parasitology*, 30(2), 95–103.
42. **McKay, J. T., Egan, R. P., Yammani, R. D., Chen, L., Shin, T., Yagita, H., & Haas, K. M.** (2015). PD-1 suppresses protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a B cell-intrinsic mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(5), 2289–2299.
43. **Nuttall P. A.** (2023). Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener klinische Wochenschrift*, 135(7-8), 165–176.

44. Oosting, M., Kerstholt, M., Ter Horst, R., Li, Y., Deelen, P., Smeekens, S., Jaeger, M., Lachmandas, E., Vrijmoeth, H., Lupse, M., Flonta, M., Cramer, R. A., Kullberg, B. J., Kumar, V., Xavier, R., Wijmenga, C., Netea, M. G., & Joosten, L. A. (2016). Functional and Genomic Architecture of *Borrelia burgdorferi*-Induced Cytokine Responses in Humans. *Cell host & microbe*, 20(6), 822–833.
45. Owyang, S. Y., Zhang, M., El-Zaatari, M., Eaton, K. A., Bishu, S., Hou, G., Grasberger, H., & Kao, J. Y. (2020). Dendritic cell-derived TGF- β mediates the induction of mucosal regulatory T-cell response to *Helicobacter* infection essential for maintenance of immune tolerance in mice. *Helicobacter*, 25(6), e12763.
46. Palounková A., 2022: Úloha osy PD-1/PD-L1 při infekci *Borrelia burgdorferi* u myši. [The role of PD-1/PD-L1 axis during *Borrelia burgdorferi* infection in mice. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
47. Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264.
48. Patil, N. K., Guo, Y., Luan, L., & Sherwood, E. R. (2017). Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2413.
49. Rahman, S., Shering, M., Ogden, N. H., Lindsay, R., & Badawi, A. (2016). Toll-like receptor cascade and gene polymorphism in host-pathogen interaction in Lyme disease. *Journal of inflammation research*, 9, 91–102.
50. Rana, V. S., Kitsou, C., Dumler, J. S., & Pal, U. (2023). Immune evasion strategies of major tick-transmitted bacterial pathogens. *Trends in microbiology*, 31(1), 62–75.
51. Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature reviews. Immunology*, 18(3), 153–167.
52. Shi, L., Chen, S., Yang, L., & Li, Y. (2013). The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 74.
53. Shin, J. J., Glickstein, L. J., & Steere, A. C. (2007). High levels of inflammatory chemokines and cytokines in joint fluid and synovial tissue throughout the course of antibiotic-refractory lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 56(4), 1325–1335.
54. Schwaiger, M., Péter, O., & Cassinotti, P. (2001). Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(9), 461–469.

55. Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W., Li, X., & Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16090.
56. Stephens, A. S., Stephens, S. R., & Morrison, N. A. (2011). Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC research notes*, 4, 410.
57. Strle, K., Shin, J. J., Glickstein, L. J., & Steere, A. C. (2012). Association of a Toll-like receptor 1 polymorphism with heightened Th1 inflammatory responses and antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 64(5), 1497–1507.
58. Strnad, M., Rudenko, N., & Rego, R. O. M. (2023). Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Virulence*, 14(1), 2265015.
59. Talbot, N. C., Spillers, N. J., Luther, P., Flanagan, C., Soileau, L. G., Ahmadzadeh, S., Viswanath, O., Varrassi, G., Shekoohi, S., Cornett, E. M., Kaye, A. M., & Kaye, A. D. (2023). Lyme Disease and Post-treatment Lyme Disease Syndrome: Current and Developing Treatment Options. *Cureus*, 15(8), e43112.
60. Thibult, M. L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., & Olive, D. (2013). PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International immunology*, 25(2), 129–137.
61. Thompson, D., Watt, J. A., & Brissette, C. A. (2021). Host transcriptome response to *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101638.
62. Vivarelli, S., Falzone, L., Torino, F., Scandurra, G., Russo, G., Bordonaro, R., Pappalardo, F., Spandidos, D. A., Raciti, G., & Libra, M. (2021). Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *International journal of oncology*, 58(2), 145–157.
63. Wang, G. (2024). *Borrelia burgdorferi* and other *Borrelia* species. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1767-1810). Academic Press.).
64. Wang, J., Deng, R., Chen, S., Deng, S., Hu, Q., Xu, B., Li, J., He, Z., Peng, M., Lei, S., Ma, T., Chen, Z., Zhu, H., & Zuo, C. (2023). Helicobacter pylori CagA promotes immune evasion of gastric cancer by upregulating PD-L1 level in exosomes. *iScience*, 26(12), 108414.
65. Wang, S. J., Dougan, S. K., & Dougan, M. (2023). Immune mechanisms of toxicity from checkpoint inhibitors. *Trends in cancer*, 9(7), 543–553.

- 66. Whiteside, S. K., Snook, J. P., Ma, Y., Sonderegger, F. L., Fisher, C., Petersen, C., Zachary, J. F., Round, J. L., Williams, M. A., & Weis, J. J. (2018).** IL-10 Deficiency Reveals a Role for TLR2-Dependent Bystander Activation of T Cells in Lyme Arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(4), 1457–1470.
- 67. Wong, K. H., Shapiro, E. D., & Soffer, G. K. (2022).** A Review of Post-treatment Lyme Disease Syndrome and Chronic Lyme Disease for the Practicing Immunologist. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 62(1), 264–271.
- 68. Yao, S., Wang, S., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., Flies, S., Xu, H., Ruff, W., Broadwater, M., Choi, I. H., Tamada, K., & Chen, L. (2009).** PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood*, 113(23), 5811–5818.
- 69. Yin, Q., Wu, L., Han, L., Zheng, X., Tong, R., Li, L., Bai, L., & Bian, Y. (2023).** Immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a review. *Frontiers in immunology*, 14, 1167975.
- 70. Zeng, G., Jin, L., Ying, Q., Chen, H., Thembinkosi, M. C., Yang, C., Zhao, J., Ji, H., Lin, S., Peng, R., Zhang, M., & Sun, D. (2020).** Regulatory T Cells in Cancer Immunotherapy: Basic Research Outcomes and Clinical Directions. *Cancer management and research*, 12, 10411–10421.
- 71. Zhang, Y., & Zheng, J. (2020).** Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248, 201
- 72. Zhao, Y., Qu, Y., Hao, C., & Yao, W. (2023).** PD-1/PD-L1 axis in organ fibrosis. *Frontiers in immunology*, 14, 1145682.
- 73. Zhou, Y. J., Li, G., Wang, J., Liu, M., Wang, Z., Song, Y., Zhang, X., & Wang, X. (2023).** PD-L1: expression regulation. *Blood science (Baltimore, Md.)*, 5(2), 77–91.

8 Použité zkratky

AB – Antibody

ACA – Acrodermatitis chronica atrophicans

APC – Antigen-presenting cell

ATB – Antibiotic

B7 – Type of integral membrane protein found on activated antigen-presenting cells

BB0323, BBE31 – *Borrelia burgdorferi* proteins

Bbss – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

BIP – B-cell inhibitory protein

BOFES – Bovine fetal serum

BSK-H – Modifikace BSK média

BSL-2 – Biosafety level 2 laboratory

C3H – Inbred strain of mouse proficient in pineal melatonin production

C57BL/6N – Inbred stain of laboratory mouse from Charles River Laboratories

CD – Cluster of differentiation

cDNA – Complementary DNA

CRASPs – Complement-regulator acquiring surface proteins

Csp – The circumsporozoite protein

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

CTV – CellTrace Violet

CXCL – Chemokine ligand family

DC – Dendritic cells

DC-SIGN – Adhesion receptor between dendritic cells and T lymphocytes

DPI – Days post infection

ECM – Extracellular matrix

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EM – Erythema migrans

Erp – Family of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins

FACS – Buffer for flow cytometry

FH – Factor H

FHL-1 – FH-like protein 1

Flt-3L – FMS-like tyrosine kinase 3 ligand

FoxP3 – Transcription factor of regulatory T cells

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, metabolic enzyme

HIV – Human immunodeficiency virus

IC – Isotypic control

ICI – Immune checkpoint inhibitors

Ig – Immunoglobulin

IL – Interleukin

IMD – Insect immune deficiency

IFN – Interferon

IVC – Individually ventilated cages

JAK/STAT –The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

LAG-3 – Lymphocyte activation gene-3

TIM-3 – T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

LD – Lyme disease

MACS – Magnetic-activated cell sorting

MEM – Minimal Essential Medium

MHC – Major histocompatibility complex

NTC – No template control

OPD – o-Phenylenediamine

Osp – Outer surface protein

PAMP – Pathogen-associated molecular pattern

PBS – Phosphate-buffered saline

PCR – Polymerase chain reaction

PD-1 – Programmed cell death 1

pDC – Plasmacytoid dendritic cells

PD-L1 – Programmed cell death 1 ligand 1

PD-L2 – Programmed cell death 1 ligand 2

PRR – Pattern recognition receptors

PTLDS – Post-treatment Lyme disease syndrome

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction

RNA – Ribonucleic acid

RPMI – Roswell park memorial institute

Salp, IRAC, TSLPI – The tick salivary protein

SEM – Standard error of mean

SNP – Single nucleotide polymorphisms

TCR – T-cell receptor

TGF – Transforming growth factor

Th – Helper T cells

TIGIT – T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains

TLR – Toll-like receptor

TNF – Tumor necrosis factor

T-PBS – Phosphate-buffered saline with Tween

Tregs – Regulatory T cells

VISTA – V-domain Ig suppressor of T-cell activation

VLs – Variable major protein-like sequence