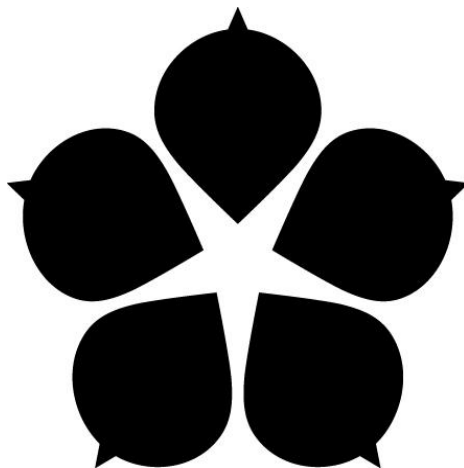


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Vliv klíštěcích cystatinů na TLR - indukovanou
maturaci myeloidních dendritických buněk.**

Diplomová práce

Hana Chytráčková

Školitel: Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.

České Budějovice 2014

Chytráčková H., 2014: Vliv klíštěcích cystatinů na TLR - indukovanou maturaci myeloidních dendritických buněk. (The effect of tick cystatins on TLR - induced maturation of myeloid dendritic cells. Mgr. thesis, in Czech). – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tick saliva contains a lot of molecules with antihemostatic and immunosuppressive effects. The goal of this thesis is to test the effects of tick salivary cystatins from *I. ricinus* and *I. scapularis* on TLR - induced maturation of bone-marrow derived dendritic cells and production of chosen cytokines. Overall, the suppressive effect of tick cystatins was observed in relation to TLR-induced maturation of DC. In addition, cystatins enhanced production of IL-10 and attenuated induction of IL-12 cytokines.

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

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce, Mgr. Jaroslavě Lieskové, PhD., za pomoc s experimenty i jejich vyhodnocením.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Klíšťata.....	1
1.1.2 Sání.....	1
1.1.2.1 Imunomodulační účinky klíštěcích slin.....	2
1.2 Cystatiny	3
1.2.1 Cystatiny typu 1	3
1.2.2 Cystatiny typu 2	4
1.2.2.1 Sialostatin L a sialostatin L2	4
1.2.3 Cystatiny typu 3	5
1.2.4 Cystatiny typu 4	5
1.3 Imunitní systém hostitele	6
1.3.1 Dendritické buňky	6
1.3.2 Buněčné rozpoznávání patogenů.....	8
1.3.2.1 Toll-like receptory (TLRs)	9
1.3.2.2 Typy TLR.....	9
1.3.2.3 Signály spouštěné pomocí TLRs.....	11
2. Cíle práce	14
3. Materiál a metody	15
3.1 Použitý materiál a chemikálie	15
3.2 Experimentální zvířata	15
3.3 Izolace buněk z kostní dřeně	15
3.4 Magnetická separace CD11c pozitivních buněk	16
3.5 Stimulace buněk TLR ligandy a přidání cystatinů	16
3.6 Příprava buněk pro analýzu pomocí průtokové cytometrie.....	17
3.7 Měření na průtokovém cytometru	17
3.9 ELISA	18
3.10 Zpracování dat.....	18
3.11 Rozdělení buněk pro experimenty.....	18
3.12 Pokus č. 1	18
3.13 Pokus č. 2	19

3.14 Pokus č. 3	19
3.15 Pokus č. 4	19
3.16 Pokus č. 5	20
4. Výsledky	21
4.1 Pokus č. 1	21
4.2 Pokus č. 2	23
4.3 Pokus č. 3	27
4.4 Pokus č. 4	30
4.5 Pokus č. 5	33
5. Diskuze.....	36
6. Závěr	39
7. Seznam zkratk	40
8. Literatura	42

1. Úvod

1.1 Klíšťata

Klíšťatovci (*Ixodida*) se řadí mezi roztoče (*Acari*), patřící do třídy pavoukoců (*Arachnida*). Do tohoto řádu spadají tři čeledi. První a zároveň největší čeledí jsou klíšťatovití (*Ixodidae*), tzv. tvrdá klíšťata. Jejich nejvýraznějšími znaky jsou pevný hřbetní štít a hlava směřující dopředu. Mezi tvrdá klíšťata patří například rody *Ixodes*, *Dermacentor* nebo *Haemaphysalis*. V České republice se nejčastěji vyskytuje klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*). V USA lze najít příbuzného klíšťete obecného, klíšťe *Ixodes scapularis*. Druhou čeleď řádu *Ixodida* tvoří tzv. měkká klíšťata, nebo též klíšťákovití (*Argasidae*). Ty od tvrdých klíšťat odlišuje zejména nepřítomnost hřbetního štítu a hlava schovaná pod tělem. Mezi měkká klíšťata se řadí například rody *Ornithodoros*, *Argas* nebo *Antricola*. Třetí čeledí jsou *Nuttalliellidae*, mezi které řadíme pouze jediný druh. *Nuttalliella namaqua* se však vyskytuje pouze v jižní Africe (Mans et al., 2011).

1.1.2 Sání

Klíšťata jsou ektoparazité, živící se krví hostitele. K tomuto způsobu získávání potravy mají speciálně uzpůsobené sací a trávící ústrojí. Rozdílné čeledi klíšťat mají odlišné způsoby krmení. Klíšťata čeledi *Ixodidae* se krmí pomalu, někdy i více než týden, a krevní ztráty, které způsobí svému hostiteli jsou poměrně malé. *Argasidae* sají velice rychle, většinou ne déle než hodinu, a způsobují větší ztrátu krve. Samice tvrdých klíšťat sají v dospělosti pouze jedenkrát před naklazením vajíček, zatímco samice měkkých klíšťat mohou sát opakovaně.

Sání je pro klíšťe náročný proces. Během evoluce se vyvinulo mnoho mechanismů, sloužících k usnadnění sání. Úspěšné sání vyžaduje, aby v místě přísátí klíšťete krev stále kolovala, nedocházelo ke koagulaci, agregaci destiček nebo vasokonstrikci. Také je třeba zamezit buněčné i humorální imunitní odpovědi hostitele. Kdyby tomu tak nebylo, klíšťe by nebylo schopné sát a uhynulo. Proto klíšťecí sliny obsahují mnoho molekul s antihemostatickou, protizánětlivou či imunomodulační aktivitou (Francischetti et al., 2009).

1.1.2.1 Imunomodulační účinky klíštěcích slin

Klíšťata vyvinula mnoho mechanismů, kterými se vyrovnává s vrozenou i adaptivní imunitní odpovědí. Látky obsažené v klíštěcích slinách působí na různé buňky imunitního systému.

Lipocaliny se vyskytují ve slinách nejen klíšťat, ale i krevsajících ploštic rodu *Triatoma* (Ribeiro et al., 2004). Tyto látky váží serotonin a histamin. Díky této schopnosti působí protisrážlivě, mimo to působí proti komplementu (Nunn et al., 2005), váží imunoglobuliny (Wang et al., 1998) a mají toxické vlastnosti (Mans et al., 2003).

Ficoliny patří do skupiny lektinů, známé jako Ixoderiny. Tyto látky velice připomínají PRPs (pattern recognition proteins), spojené s aktivací komplementu u savců. Na svém konci mají doménu podobnou komplementové složce C3. Byly objeveny u mnoha druhů tvrdých i měkkých klíšťat (Rego et al., 2005).

Mnoho molekul v klíštěcích slinách ovlivňuje aktivitu dendritických buněk. Příkladem je prostaglandin E2 (PGE) klíšťat *Ixodes scapularis* a *Rhipicephalus sanguineus*, který působí jako inhibitor produkce IL-12 a TNF α , zatímco produkci IL-10 u dendritických buněk derivovaných z kostní dřeně (BMDC) zvyšoval v odpovědi na TLR ligandy (Sa-Nunes et al., 2007). Takto na dendritické buňky působil i adenosinový nukleotid. Tento proces je spouštěn přes cyklický adenosin monofosfát (cAMP), což vede k aktivaci proteinové kinázy A (PKA). Tento enzym hraje důležitou roli v modulaci cytokinové odpovědi (Su et al., 2008).

Druhým příkladem klíštěcí molekuly působící na dendritické buňky je Salp15 klíštěte *Ixodes scapularis*. Naše klíště *Ixodes ricinus* exprimuje tři homology tohoto proteinu (Hovius et al., 2007). Salp15 moduluje imunitu hostitele tím, že se váže na povrchový protein borrelií (OspC), čímž brání destrukci bakterií protilátkami hostitele (Ramamoorthi et al., 2005). Mimo to inhibuje CD4, čím se podílí na inhibici proliferace T lymfocytů (Garg et al., 2006). Salp15 se také váže na lektinový receptor DC-SIGN, který je exprimován dermálními dendritickými buňkami. Tento receptor je nezbytný pro rozpoznání patogenu (Geijetenbeek et al., 2009). Interakce Salp15 s DC-SIGN vede k inhibici produkce IL-6, IL-12p70, IL-1 β a TNF α u dendritických buněk aktivovaných TLR ligandy nebo borreliemi, zatímco produkce IL-10 byla zvýšena. Přítomnost Salp15 tedy inhibovala aktivaci T lymfocytů (Hovius et al., 2008).

Mezi významné imunomodulátory působící na dendritické buňky obsažené v klíštěcích slinách patří cystatiny.

1.2 Cystatiny

Cystatiny jsou skupinou vratných inhibitorů, působících na papainu podobné cysteinové proteázy a legumainové proteázy. Byly objeveny v mnoha různých organismech, obratlovcích, bezobratlých, a dokonce i v rostlinách a prvocích. Účastní se mnoha biologických procesů, například prezentace antigenu, rozvoje imunitního systému, chemotaxe neutrofilů během zánětu a apoptózy (Honey a Rudensky, 2003). Jako regulátory proteolýzy jsou také spojené s buněčnou/ tkáňovou homeostázou.

Cystatiny se dělí na 4 základní skupiny, typ 1 (intracelulární), typ 2 (extracelulární), typ 3 (kininogeny) a typ 4 (fetuiny, proteiny bohaté na histidin) (Rawlings a Barret, 1990). Někdy se však uvádějí pouze 3 typy. Cystatiny typu 1 a 2 byly objeveny u množství měkkých i tvrdých klíšťat.

1.2.1 Cystatiny typu 1

Cystatiny typu 1, také známé jako stefiny, jsou intracelulární. Poprvé byly objeveny v cytosolu lidských polymorfonukleárních granulocytů a označeny jako cystatin A (Brzin et al., 1983). Další byly objeveny v mnoha typech buněk a v malém množství i v tělních tekutinách. Jsou silnými inhibitory papainu, katepsinů L, S a H a v menší míře inhibují i katepsin B. Tyto proteiny nemají žádné karbohydrátové postranní řetězce, signální protein ani disulfidické můstky, což je odlišuje od cystatinů ostatních typů.

Klíštěcí cystatiny typu 1 byly objeveny u pěti různých druhů tvrdých klíšťat ze čtyř rodů. Všechny lze najít v klíštěcím střevě nebo slinných žlázách. První byl biochemicky charakterizován Bmcystatin klíštěte *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Lima et al., 2006). Dále byly cystatiny typu 1 objeveny u klíšťat *Rhipicephalus sanguineus* (Anatriello et al., 2010), *Ixodes scapularis* (Ribeiro et al., 2006), *Haemaphysalis longicornis* (Zhou et al., 2006) a *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 2008). Tyto cystatiny jsou velmi odlišné od cystatinů typu 1 ostatních živočichů.

1.2.2 Cystatiny typu 2

První cystatin typu 2 byl objeven v roce 1968 z kuřecího vejce (Fossum a Whitaker, 1968). Tento inhibitor reagoval s papainem a katepsiny B a C. Tyto sekreční proteiny se od cystatinů typu 1 odlišují zejména strukturou, mají signální peptid a dva disulfidické můstky. Mimo to jsou extracelulární, nachází se ve většině tělních tekutin a mají vyšší molekulovou hmotnost než cystatiny typu 1. Patří mezi ně i lidský cystatin C.

Většina studovaných klíštěcích cystatinů patří mezi cystatiny typu 2. Dosud bylo objeveno 14 těchto inhibitorů cysteinových proteáz, 2 jim podobné proteiny klíštěte *Ornithodoros coriaceus*, a 9 z nich bylo plně funkčně charakterizováno.

Další cystatiny typu 2 byly objeveny u mnoha různých druhů tvrdých i měkkých klíšťat, například cystatiny Hlcyst-2, Hlcyst-3 a HISC-1 klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Zhou et al., 2006) nebo Om-cystatin 1 a Om-cystatin 2 klíštěte *Ornithodoros moubata* (Grunclová et al., 2006).

Do této skupiny patří sialostatin L, sialostatin L2 a mnoho dalších.

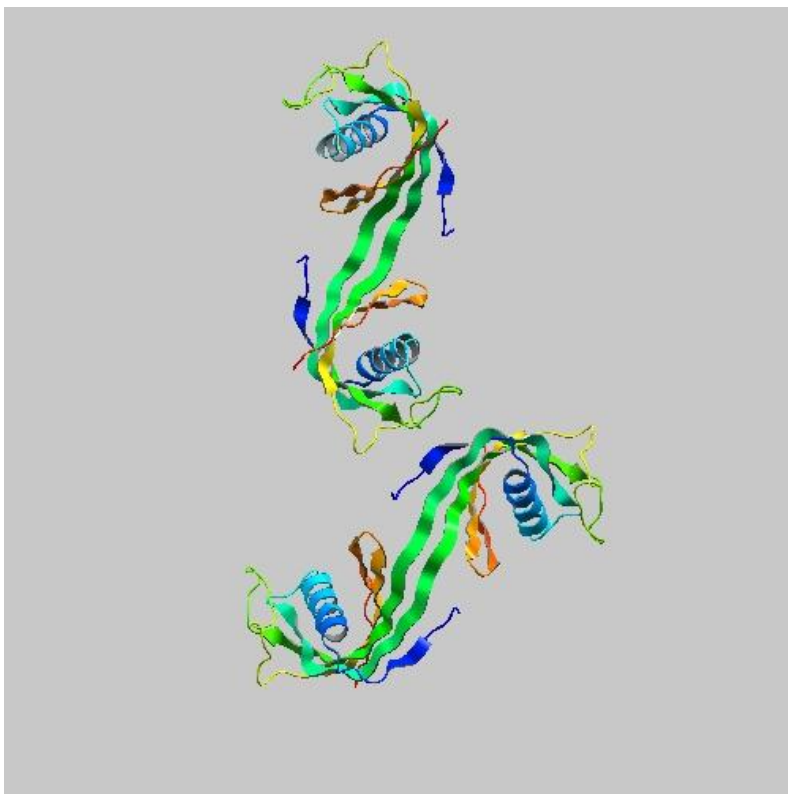
1.2.2.1 Sialostatin L a sialostatin L2

Sialostatin L a sialostatin L2 jsou cystatiny klíštěte *Ixodes scapularis*. Jako první byl objeven sialostatin L (Valenzuela et al., 2002). Jméno dostal podle své funkce, inhibuje katepsin L. O několik měsíců byl popsán sialostatin L2 ze slin stejného klíštěte, a posléze i funkčně charakterizován (Ribeiro et al., 2006).

Oba tyto cystatiny působí jako silné inhibitory katepsinu L. Sialostatin L navíc inhibuje katepsin S. U sialostatinu L2 byl objeven pouze velice slabý účinek na tento katepsin. Na rozdíl od ostatních cystatinů, sialostatin L ani sialostatin L2 nepůsobí jako inhibitory katepsinů B a H (Kotsyfakis et al., 2007).

Katepsiny v organismu hrají důležitou roli při zpracování antigenu a dozrávání komplexu MHC II. Studie s myšimi dendritickými buňkami, které neexprimují katepsin L, dokázaly, že pouze sialostatin L byl schopný působit na prezentaci antigenu (Hsing a Rudensky, 2005). Mimo to byla v přítomnosti tohoto sialostatinu silně narušena prezentace antigenu zprostředkovaná katepsinem S (Sa-Nunes et al., 2009).

U sialostatinu L2 nebyl objeven žádný výrazný efekt na modulaci prezentace antigenu. Přesto je pro úspěšné sání klíčště nezbytný (Kotsyfakis et al., 2007).



Obr. 1: Struktura sialostatinu L.

zdroj: <http://pdj.org/mine/summary/3li7>

1.2.3 Cystatiny typu 3

Cystatiny typu 3, známé také jako kininogeny, jsou velké sekretované multidoménné proteiny obsahující 8 disulfidických můstků. Nacházejí se v tělních tekutinách a účastní se například obrany proti volným lysozomálním cysteinovým proteázám nebo proteázám invadujících mikroorganismů, mimo to řídí adaptivní imunitu (Scharfstein et al., 2007).

1.2.4 Cystatiny typu 4

Cystatiny typu 4, nebo také fetuiny a glykoproteiny bohaté na histidin jsou také sekreční proteiny, které řadíme mezi cystatiny, postrádají však vlastnosti inhibitorů cysteinových proteáz (Brown and Dziegielewska, 1997).

1.3 Imunitní systém hostitele

Imunitní systém hostitele se skládá ze dvou základních typů imunitní odpovědi, vrozené a získané (adaptivní). Vrozená imunita je nespecifická a účastní se jí hlavně monocyty, makrofágy, polymorfonukleáry a dendritické buňky.

Získaná imunita je mnohem specifičtější, navíc je zde možnost indukce imunologické paměti, která může být i doživotní. Buňkami získané imunity jsou zejména T a B lymfocyty. B lymfocyty nesou protilátkové molekuly jako receptory pro antigen, po aktivaci se mění na paměťové a plasmatické buňky, které produkují protilátky. T lymfocyty rozpoznávají antigen na rozdíl od B lymfocytů společně s antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Rozpoznání antigenu vede k diferenciaci na paměťové a efektorové buňky, které se dělí na 2 základní subpopulace, cytotoxické Tc CD8+ lymfocyty a pomocné (helper) Th CD4+ lymfocyty. Někdy se uvádí i třetí subpopulace, supresorové Ts lymfocyty.

Buňky vrozené i získané imunity spolu velmi úzce spolupracují. Buňky vrozené imunity, jako makrofágy a zejména dendritické buňky fungují jako antigen prezentující buňky (APC). Tyto buňky internalizují antigen, degradují ho na malé peptidy, které vystaví na svém povrchu v komplexu s MHC. Tento komplex je následně rozpoznán T lymfocyty, což vede k jejich aktivaci. Produkované cytokiny a chemokiny dále rozhodují, zda odpověď bude spíše buněčná, zprostředkovaná cytotoxickými T lymfocyty, nebo humorální, zprostředkovaná protilátkami produkovanými plasmatickými buňkami. Mimo to některé cytokiny produkované T buňkami zesilují schopnost fagocytózy u buněk vrozené imunity (Doan, Thao, 2008).

1.3.1 Dendritické buňky

Tyto buňky byly poprvé popsány na konci 19. století německým patologem a biologem Paulem Langerhansem, po kterém jsou také pojmenovány Langerhansovy buňky, dendritické buňky vyskytující se v kůži. Termín dendritické buňky byl zaveden kanadským imunologem Ralphem M. Steinmanem a buněčným biologem Zanvilem A. Cohnem v roce 1973.

Dendritické buňky jsou jedním z typů bílých krvinek vyskytujících se v krvi a tkáních. Jejich velikost se obvykle pohybuje kolem 7 μ m. Svůj název získaly podle svého charakteristického tvaru s četnými výběžky, který připomíná dendrity neuronů. Vznikají v kostní dřeni z CD34 pozitivní hematopoetické kmenové buňky (hemocytoblast), která se

dále diferencuje buď na myeloidní progenitor, z kterého vznikají kromě dendritických buněk ještě granulocyty, žírné buňky, megakaryocyty, erytroblasty, monocyty a makrofágy, nebo na lymfoidní progenitor, ze kterého vznikají kromě dendritických buněk lymfocyty a NK buňky. Podle buněčných progenitorů se tedy dendritické buňky dělí na dva základní typy (Lewis a Reizis, 2012).

Plasmacytoidní dendritické buňky jsou velmi podobné protilátky produkujícím plasmatickým buňkám, ale funkčně připomínají spíše myeloidní dendritické buňky. Jsou také schopné produkovat velké množství interferonu α a interferonu β . Druhým typem jsou konvenční dendritické buňky, které jsou velice podobné monocytům.



Obr. 2: Dendritická buňka.

zdroje: http://www.nephronpower.com/2011_10_01_archive.html

Existuje ještě jeden typ dendritických buněk, tzv. folikulární DC, které s klasickými DCs nejsou příbuzné, protože pocházejí z mezenchymální prekurzorové buňky, avšak podobají se jim funkčně i morfologicky (Tew et al., 1997).

Dendritické buňky představují značně heterogenní populaci buněk nesoucích však několik společných znaků. Všechny dendritické buňky jsou si podobné hlavně společnou expresí molekul CD11c, CD80, CD86 a MHCII. Naopak se od sebe jednotlivé subsety liší např. expresí CD11b.

Dendritické buňky se nacházejí v mnoha tkáních, které jsou v kontaktu s vnějším prostředím, zejména v kůži (Langerhansovy buňky epidermis), sliznici nosu a plic, žaludku a střevech. Nezralé dendritické buňky lze nalézt v krvi, poté migrují do lymfatických orgánů, uzlin a sleziny, kde spolupracují s T a B lymfocyty jako antigen prezentující buňky.

Dendritické buňky jsou schopné fagocytózy. Tato schopnost se liší mezi nezralými a zralými (maturovanými) buňkami. Maturované DC schopnost fagocytovat ztrácejí. Dendritické buňky, po rozpoznání a zpracování patogenu, na svém povrchu exponují peptidy fagocytovaných mikroobů společně s antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), které jsou detekovatelné T lymfocyty. Proto jsou dendritické buňky důležitou součástí vrozené imunity a fungují jako nejúčinnější antigen - prezentující buňky (APC). Díky tomu jsou schopny spouštět a regulovat odpověď adaptivní imunity. Odpověď T buněk rovněž regulují pomocí množství produkovaných cytokinů a chemokinů. Zvláštní význam mají zejména interleukin 10 (IL-10) a interleukin 12 (IL-12).

Interleukin 10, nazývaný také inhibiční faktor cytokinové syntézy, působí protizánětlivě, inhibuje syntézu prozánětlivých cytokinů a účastní se indukce Th2 buněčné odpovědi, která stimuluje B lymfocyty a tím humorální, protilátkovou odpověď.

IL-12 působí prozánětlivě a podporuje vývoj Th1 buněčné odpovědi, která stimuluje cytotoxické T lymfocyty, makrofágy a NK buňky. Nové výzkumy navíc dokazují jejich důležitou roli při tlumení imunitní odpovědi a vytváření periferní resistance spojené s tvorbou anergických nebo neodpovídajících T-lymfocytů a regulačních T-lymfocytů (Steinman et al., 2007; Steinman 2008).

1.3.2 Buněčné rozpoznávání patogenů

Imunitní systém rozpoznává patogeny pomocí receptorů obecně známých jako vzory rozpoznávající receptory (PRRs, pattern recognition receptors). Tyto receptory, kódované geny zárodečné linie (germ-line genes), rozpoznávají široké spektrum mikrobiálních struktur, konkrétně vzory patogenity (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) a aktivují buňky vrozené imunity, včetně dendritických buněk (Steinman a Banchereau., 2007; Steinman 2008). Mezi PRRs patří toll-like receptory (TLRs), lectin-like receptory typu C (CLRs), RIG-I like receptory (RLRs) a Nod-like receptory (NLRs).

Nejen buňky imunitního systému, ale i ostatní buňky exprimují velké množství těchto receptorů, které jsou schopné vyvolat odpověď na patogeny. U dendritických buněk, nejúčinnějších antigen prezentujících buněk, bylo objeveno a charakterizováno několik typů receptorů, podílejících se na regulaci typu, kvality a síly imunitní odpovědi. Ačkoliv i u CLRs, RLRs a NLRs byla prokázána důležitá role při modulaci adaptivní imunity, nejvíce

zjištění nám poskytují analýzy funkce TLRs při modulaci T-buněčné imunity namířené proti patogenům (Manicassamy a Pulendran, 2009).

1.3.2.1 Toll-like receptory (TLRs)

TLRs jsou rodinou evolučně konzervovaných PRRs, které rozpoznávají velmi široké spektrum mikrobiálních komponent. Jsou to transmembránové proteiny typu 1 (1x prochází membránou), skládající se ze 3 domén.

První je na leucin bohatá opakující se sekvence na C-konci (LRR), která rozpoznává mikrobiální komponenty, dále pak centrální transmembránová doména a na N-konci cytoplasmatická TIR (Toll/IL-1R homologní doména) signální doména (Akira et al., 2006). TLRs mohou být exprimovány jako homodimery, nebo heterodimery (TLR 2+ TLR 1, nebo TLR 2 + TLR 6).

U savčích buněk se vyskytuje nejméně 11 typů těchto receptorů (Takeda et al., 2003). Toll-like receptory byly objeveny nejen u dendritických buněk, ale i u mnoha dalších, jako jsou makrofágy, NK buňky (natural killer), žírné buňky, neutrofilů, B buňky, T buňky, a u neimunitních buněk, fibroblastů, epitelálních buněk a keratinocytů.

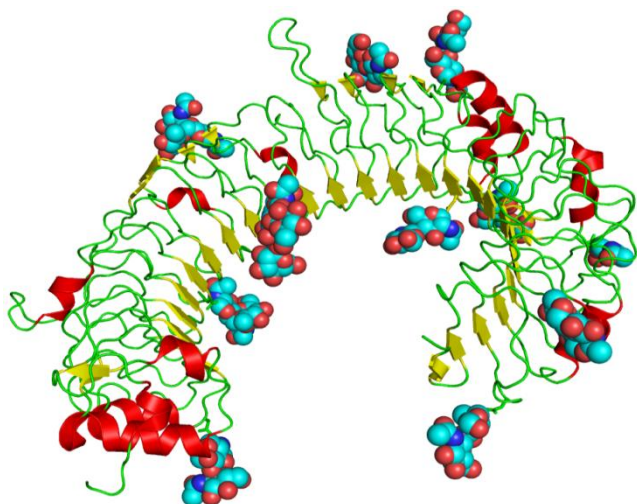
Většina TLRs (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 a 11) je exprimována na povrchu buněk, ačkoliv několik z nich (TLR 3, 7, 8 a 9) je prezentováno uvnitř endosomálních komponent, při jejich aktivaci je tedy využito schopnosti dendritických buněk fagocytovat patogeny.

1.3.2.2 Typy TLR

Každý typ TLR rozpoznává různé mikrobiální stimuly. TLR 1, označován jako CD281 (diferenciační skupina, cluster of differentiation), rozeznává molekulární vzory specifické pro gram-pozitivní bakterie. Mezi ligandy rozpoznávané tímto receptorem patří bakteriální peptidoglykan a (triacyl)lipoproteiny, ovšem pouze v heterodimeru s TLR 2. TLR 1 se nachází zejména na membránách makrofágů a neutrofilů (Takeuchi et al., 2002).

TLR 2, označován jako CD282, rozpoznává zejména komponenty bakteriální stěny, jako jsou peptidoglykany gram-pozitivních bakterií, lipoproteiny bakterií rodu *Mycobacterium*, lipoteichoickou kyselinu (LTA, lipoteichoic acid) a některé komponenty buněčné stěny hub (Takeuchi et al., 1999).

TLR 3, označován jako CD283, je jedním z intracelulárních receptorů, a tudíž k jeho aktivaci dochází po fagocytóze patogenu. Rozpoznává virovou dvouvláknovou RNA, kterou nesou například retroviry (Manicassamy a Pulendran, 2009).



Obr. 3: Struktura TLR 3.

Zdroje: <https://www.boundless.com/microbiology/immunology--2/innate-defenders/toll-like-receptors/>

TLR 4 (CD284) ve spolupráci s MD proteinem a CD rozpoznává lipopolysacharidy (LPS) ze stěny většiny gram-negativních bakterií, které fungují jako endotoxiny, aktivují imunitní systém a vyvolávají silnou sekreci pro-zánětlivých cytokinů (Hoebe et al., 2003).

TLR 5 (CD285) rozpoznává flagellin, ze kterého jsou utvářeny bakteriální bičíky gram-negativních i gram-positivních bakterií. Tento protein se vyskytuje u všech bičíkatých bakterií v hojném množství a je faktorem virulence. Rozpoznání flagellinu pomocí TLR 5 vede k zvýšené produkci TNF α (tumor necrosis factor α), (Hayashi et al., 2001).

TLR 6 (CD286) vytváří heterodimer společně s TLR 2, a v tomto komplexu se účastní rozpoznávání zejména peptidoglykanů gram-positivních bakterií a lipoproteinů bakterií rodu *Mycobacterium* (Takeuchi et al., 1999).

TLR 7 (CD287) je dalším z intracelulárních receptorů, jejichž aktivace vyžaduje fagocytózu patogenu. Rozpoznává jednořetězcovou RNA v endosomech, díky čemuž se

podílí na protivirové imunitě. Mimo to je TLR 7 schopen rozpoznat i malé syntetické imunomodulátory, jako je imiquimod (Diebold et al., 2004).

TLR 8 (CD288) je intracelulární receptor velice podobný TLR 7. Stejně jako TLR 7 rozpoznává jednovláknovou RNA a některé malé syntetické imunomodulátory, jako R-848 nebo loxoribin (Heil et al., 2004). Kromě toho jsou některé genetické varianty TLR 8 v poslední době spojovány s citlivostí vůči plicní tuberkulóze.

TLR 9 (CD289) je posledním z intracelulárních receptorů. Studie prokázaly, že tento receptor zprostředkovává buněčnou odpověď na bakteriální či virovou DNA tím, že rozpoznává nemetylované CpG oligodeoxynukleotidové sekvence (cytosin trifosfát C spojený s guanin trifosfátem G fosfodiesterickou vazbou p) (McCluskie a Krieg., 2006).

TLR 10 (CD290) je exprimován na buněčném povrchu a jeho funkce není zcela známá. Bylo objeveno několik různých transkripčních variant kódujících ten samý protein (Chuang a Ulevitch, 2001).

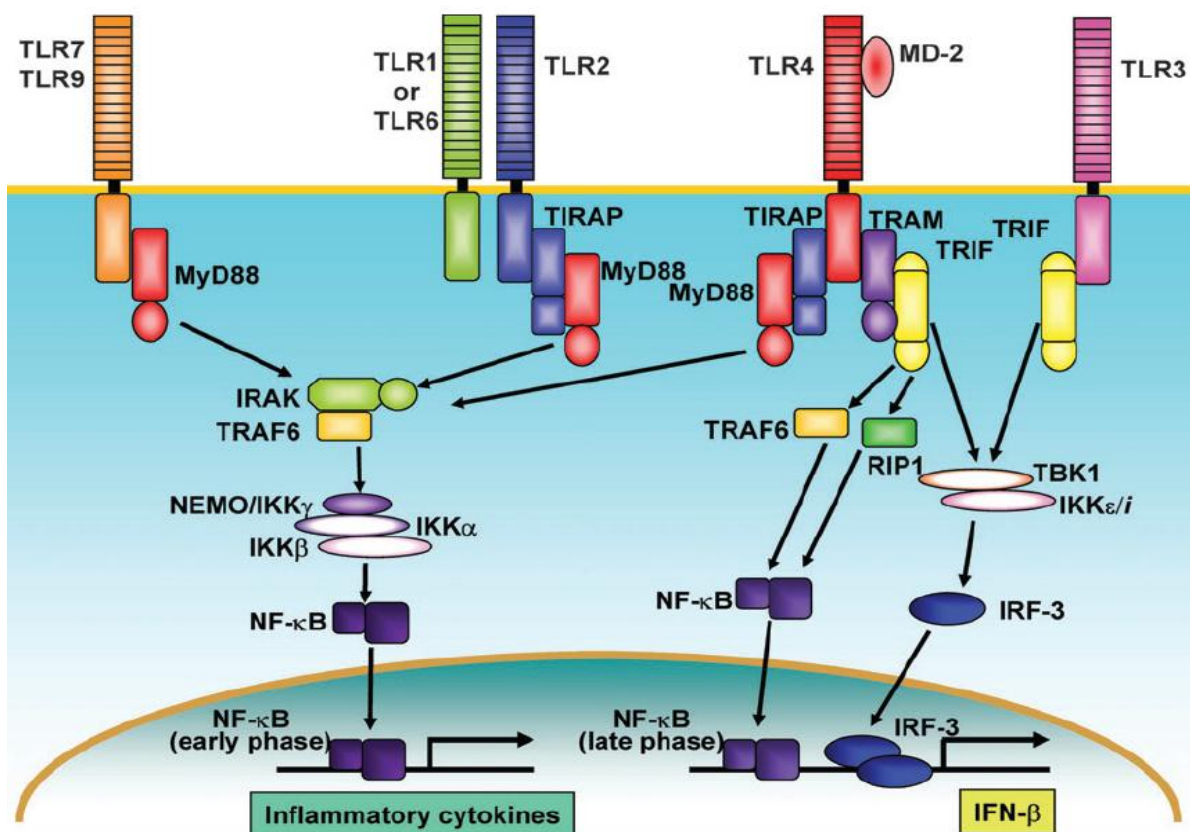
TLR 11 (CD291) rozpoznává profilin a flagellin na povrchu některých bakterií. Účastní se aktivace vrozené i adaptivní imunity díky aktivaci TNF α a IL-12, a také sekreci IFN γ (interferon). TLR 11 se uplatňuje v imunitní odpovědi proti různým bakteriím, jakými jsou například původce toxoplasmózy *Toxoplasma gondii*, někteří zástupci rodu *Salmonella* nebo uropatogenní bakterie jako *Escherichia coli* (Yarovinski et al., 2005).

1.3.2.3 Signály spouštěné pomocí TLRs

Interakce TLR se specifickým ligandem vede k připojení intracelulárních adaptérů obsahujících TIR-doménu, jako MyD88, TIRAP, TRIF a TRAM, zprostředkovanému interakcí TIR-domén adaptéru a receptoru. Tento proces pokračuje připojením proteinů z rodiny IRAK (IRAK 1, 2, 4 a IRAK-M - kinázy spojené s receptorem interleukinu 1) a TRAF6 (faktor 6 spojený s TNF receptorem), vedoucím k aktivaci MAP kináz a transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1, které jsou klíčové pro indukci zánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Kromě toho také TLR signalizace spouští upregulaci markerů buněčného zrání jako jsou CD80, CD83, CD86 a CCR7 (chemokinový receptor).

Každý TLR váže specifický adaptér a aktivuje odlišnou signální dráhu, na jejímž konci je aktivace různých transkripčních faktorů. Všechny TLR, kromě TLR 3, zprostředkovávají signalizaci přes protein MyD88 (Medzhitov a Janeway, 2000). Signalizace pomocí TLR 3 je

závislá na adaptéru TRIF. To vede k aktivaci serin/treonin-proteinové kinázy (TBK1) a interferon regulačního faktoru 3 (IRF3). Výsledkem je silná indukce interferonu β (Yamamoto et al., 2003).



Obr. 4: TLR signální dráhy.

zdroj: <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3397/fulltext.php?bframe=figures.htm>

TLR 4 využívá signalizaci přes protein MyD88 i přes TRIF. Navíc signalizace pomocí TLR 4 selektivně využívá adaptorový protein TRAM. Signalizační dráha pomocí proteinu MyD88 vede k aktivaci MAP kináz a transkripčního faktoru NF- κ B, zatímco dráha využívající protein TRIF aktivuje interferon regulační faktor 3 (IRF3) a vede k indukci interferonu β genů. Pravděpodobně díky těmto dvěma signalizačním drahám se TLR 4 ligandy, jako například LPS, ukazují jako nejsilnější aktivátory proliferace myeloidních dendritických buněk.

TLR 4 a TLR 2 navíc interagují s proteinem TIRAP, ačkoliv jeho funkce není zcela známá.

TLRs se nacházejí na různých typech buněk. TLR7 a TLR9 jsou hojně exprimovány na plasmocytoidních dendritických buňkách, zatímco jejich exprese na myeloidních dendritických buňkách je slabší, TLR 2, 3, 4, 5 a 8 jsou exprimovány na myeloidních dendritických buňkách (Cao a Liu, 2007).

Aktivace TLR 7 a TLR 9 vede přes MyD88 k fosforylaci a aktivaci transkripčního faktoru IRF 7, který je hlavním regulátorem produkce interferonů typu I.

2. Cíle práce

- Optimalizovat podmínky navození maturace myeloidních dendritických buněk po přidání TLR ligandů, změřit povrchovou expresi komplexu MHC II, kostimulačních molekul CD80 a CD86 a stanovit produkci cytokinů (TNF α , IL-10, IL-12).
- Zhodnotit vliv klíčících cystatinů na maturaci DCs (měřením povrchové exprese MHC II, CD80 a CD86) po stimulaci různými TLR ligandy.
- Stanovit vliv klíčících cystatinů na produkci vybraných cytokinů (TNF α , IL-10, IL-12).

3. Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

- sterilní PBS
- izopropanol
- MEM
- NH₄Cl
- RPMI 1640
- BOFES
- GM - CSF
- EDTA
- LPS
- LTA
- IQ
- POLY I:C
- roztok trypanové modři
- protilátky - antiMHC II, antiCD80, antiCD86, antiCD11c
- magnetické kuličky - antiCD11c
- propidium bromid
- kit pro ELISA
- cystatiny - CPI 1 a CPI 2 klišťete *Ixodes ricinus*, sialostatin L a sialostatin L2 klišťete *Ixodes scapularis*

3.2 Experimentální zvířata

Pro experimenty byly použity myši samice kmene C57BL/6N ve věku 6-10 týdnů, chované ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích za standartních podmínek.

3.3 Izolace buněk z kostní dřene

Myš byla usmrcena zlomením vazů. Zadní nohy byly staženy z kůže, odstřiženy a opláchnuty ve sterilním PBS. Ze zadních nohou byla vypreparována stehenní a holenní kost tak, aby zůstala nepoškozena. Očištěné kosti byly opláchnuty v izopropanolu vloženy do Petriho misky s MEM. Konce kostí byly odstřiženy a kostní dřev injekční stříkačkou

vypláchnuta do nové Petriho misky s MEM. Pomocí pipety s modrou špičkou byla dřev rozsuspendována, přefiltrována před BD filtr a stočena 10 minut při zrychlení 196 g a teplotě 4°C. Erytrocyty, přítomné v buněčném peletu, byly lyzovány pomocí 2 ml 0,84% NH₄Cl ohřátého na 37°C. Po dvou minutách byla lůžka zastavena přidáním 10 ml MEM. Následovalo počítání buněk v Bürkerově komůrce, stočení a naředění v BMDC médiu (RPMI + 10% BOFES + ATB + Mercaptoetanol + 30 ng/ml GM-CSF) na koncentraci 10⁶ buněk/ml. Suspenze byla rozkapána do 6-jamkového panelu po 2ml na jamku, tedy 2x10⁶ buněk/ 1 jamka. Buňky byly kultivovány týden v CO₂ inkubátoru při teplotě 37°C, každé 2-3 dny bylo 70% média vyměněno, nebo byly přidány 2ml nového média.

3.4 Magnetická separace CD11c pozitivních buněk

Po týdenní inkubaci byly buňky z panelu odebrány a stočeny v centrifuze 10 minut při zrychlení 196 g a teplotě 4°C. Po slítí supernatantu se k peletu přidalo 10 ml MACS pufru (PBS + 2% BOFES + 1mM EDTA) a následovala další centrifugace. Po opětovném slítí supernatantu bylo k buňkám přidáno 75µl CD11c magnetických kuliček a MACS pufr na celkový objem 1,5 ml. Poté byly buňky inkubovány 15 minut na ledu. Poté byly buňky promyty desetinásobným objemem MACS pufru a stočeny. Mezitím byla připravena kolonka 3ml MACS pufru. Po stočení a slítí supernatantu byly buňky rozsuspendovány v 500 µl MACS pufru a nakapány na kolonku. Kolonka byla třikrát promyta 3 ml MACS pufru. Po vyndání z magnetického stojanu byla kolonka nasazena na zkumavku a buňky byly eluovány 5 ml RPMI + 10% BOFES pomocí pístu. Poté byly buňky spočítány a rozředěny do 24-jamkového panelu.

3.5 Stimulace buněk TLR ligandy a přidání cystatinů

Buňky po inkubaci nebo po magnetické separaci byly rozděleny do 96-jamkového panelu po 150 000 buněk/jamka (50 µl). Buňky byly rozděleny do několika skupin. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze RPMI médium s 10% BOFES (150 µl). K buňkám stimulovaným ligandem bylo přidáno LPS, LTA nebo IQ, naředěné v RPMI médiu na požadovanou koncentraci (LPS - 100 ng/ml; LTA - 2 µg/ml; IQ - 2 µg/ml). K posledním 3-4 skupinám buněk byl přidán do RPMI s TLR ligandem jeden z použitých cystatinů tak, aby výsledná koncentrace inhibitoru byla 3 µM. Poté byly buňky inkubovány v termostatu při teplotě 37°C v 5% atmosféře CO₂ po dobu 24 hodin.

3.6 Příprava buněk pro analýzu pomocí průtokové cytometrie

Po 24-hodinové inkubaci byly supernatanty odebrány a uloženy pro pozdější analýzy (ELISA). Buňky byly drženy na ledu a po omytí vychlazeným PBS (200 μ l) bylo do každé jamky napipetováno 200 μ l studeného 0,005M EDTA v PBS. Po 20 minutách byly buňky přeneseny na U-panel. Přenesené buňky byly stočeny 2 minuty při zrychlení 353g a teplotě 4°C. Po slítí supernatantu byly buňky promyty 150 μ l promývacího pufru (PBS + 1% BOFES) a stočeny. Supernatant byl opět odebrán a buňky byly připraveny na značení. Do každé jamky s buňkami bylo přidáno 20 μ l protilátek (anti-CD11c značeno APC nebo PE, anti-MHC II značeno PE-Cy5 nebo Alexa700, anti-CD80 značeno FITC a anti-CD86 značeno PE nebo APC; vše od firmy eBioscience), ředěných v poměru 1:100. Značené buňky byly inkubovány 20 minut v lednici, poté byly opět 2x promyty stejným způsobem, jako před značením, a rozsuspendovány v 150 μ l promývacího pufru. Takto připravené buňky byly měřeny na průtokovém cytometru.

V experimentech, kde bylo použito vícebarevné značení, se navíc připravovaly kompezační kontroly, které byly vždy směsí buněk značených jednou protilátkou a buněk neznačených.

3.7 Měření na průtokovém cytometru

Značené buňky byly měřeny na průtokovém cytometru FACS Canto II. K analýze sloužil BD FACS-Diva software. Tabulka I. uvádí nastavení parametrů cytometru.

Tab. I: Nastavení parametrů FACS.

FSC	245
SSC	400
FITC	520
PE	400
PE-TEXAS RED	600
APC	400
Alexa 700	600

3.9 ELISA

Koncentrace cytokinů TNF- α , IL-10 a IL-12 byla zjišťována metodou ELISA využitím kitu Ready-set-go od firmy eBioscience dle instrukcí výrobce.

3.10 Zpracování dat

K analýze dat získaných z měření na průtokovém cytometru a metodou ELISA byl použit program MS Excel (statistická významnost byla vypočtena pomocí statistického programu Student t-test, rovněž směrodatná odchylka, které je znázorněna v grafech).

3.11 Rozdělení buněk pro experimenty

Pro první pokus byly buňky rozděleny podle následujícího schématu:

- A) Kontrolní nestimulované buňky
- B) Buňky stimulované LPS
- C) Buňky stimulované LTA
- D) Buňky stimulované IQ
- E) Buňky stimulované POLY I:C

Pro ostatní experimenty bylo použito následující schéma:

- A) Kontrolní nestimulované buňky
- B) Buňky stimulované TLR ligandem (LPS, LTA, IQ, POLY I:C)
- C) Stimulované buňky s přidaným cystatinem CPI 1
- D) Stimulované buňky s přidaným cystatinem CPI 2
- E) Stimulované buňky s přidaným cystatinem sialoL
- F) Stimulované buňky s přidaným cystatinem sialoL2

3.12 Pokus č. 1

Optimalizace metody, stimulace dendritických buněk TLR ligandy

Dendritické buňky byly derivovány pomocí GM-CSF. Magnetická separace po přečištění od CD11c negativní populace nebyla použita. Buňky byly nasazeny do panelu a stimulovány pouze TLR ligandy. Po 24 hodinách byly buňky značeny protilátkami rozeznávajícími komplex MHC II (značeno PE-Cy5). Metodou ELISA byla z odebraného supernatantu změřena koncentrace cytokinu TNF- α .

3.13 Pokus č. 2

Vliv klíčících cystatinů na LPS indukovanou maturaci dendritických buněk

Dendritické buňky byly derivovány s GM-CSF. Magnetická separace pro přečištění od CD11c negativní populace nebyla použita. Buňky byly nasazeny do panelu a stimulovány v přítomnosti cystatinu. Po 24 hodinách byly buňky značeny protilátkami rozeznávajícími CD80 (FITC), CD86 (APC), MHC II (PE-Cy5) a CD11c (PE). Metodou ELISA byly z odebraných supernatantů stanoveny koncentrace cytokinů TNF- α , IL-10 a IL-12.

3.14 Pokus č. 3

Vliv klíčících cystatinů na LTA indukovanou maturaci dendritických buněk

Dendritické buňky byly derivovány s GM-CSF a následně přečištěny od CD11c negativní populace magnetickou separací. Buňky byly nasazeny do panelu a stimulovány v přítomnosti cystatinu. Po 24 hodinách byly buňky značeny protilátkami rozeznávajícími CD80 (FITC), CD86 (APC nebo PE), MHC II (PE-Cy5 nebo Alexa700) a CD11c (PE nebo APC). Metodou ELISA byly z odebraných supernatantů stanoveny koncentrace cytokinů TNF- α , IL-10 a IL-12.

3.15 Pokus č. 4

Vliv klíčících cystatinů na IQ indukovanou maturaci dendritických buněk

Dendritické buňky byly derivovány s GM-CSF a následně přečištěny od CD11c negativní populace magnetickou separací. Buňky byly stimulovány v přítomnosti cystatinu. Po 24 hodinách byly buňky značeny protilátkami rozeznávajícími CD80 (FITC), CD86 (APC nebo PE), MHC II (PE-Cy5 nebo Alexa700) a CD11c (PE nebo APC).. Metodou ELISA byly z odebraných supernatantů stanoveny koncentrace cytokinů TNF- α , IL-10 a IL-12.

3.16 Pokus č. 5

Vliv klíčtých cystatinů na POLY I:C indukovanou maturaci dendritických buněk

Dendritické buňky byly derivovány s GM-CSF. Magnetická separace pro přečištění od CD11c negativní populace nebyla použita. Buňky byly stimulovány v přítomnosti cystatinu. Po 24 hodinách byly buňky značeny protilátkami rozeznávajícími CD86 (PE) a MHC II (PE-Cy5). Metodou ELISA byly z odebraných supernatantů stanoveny koncentrace cytokinů TNF- α a IL-10 .

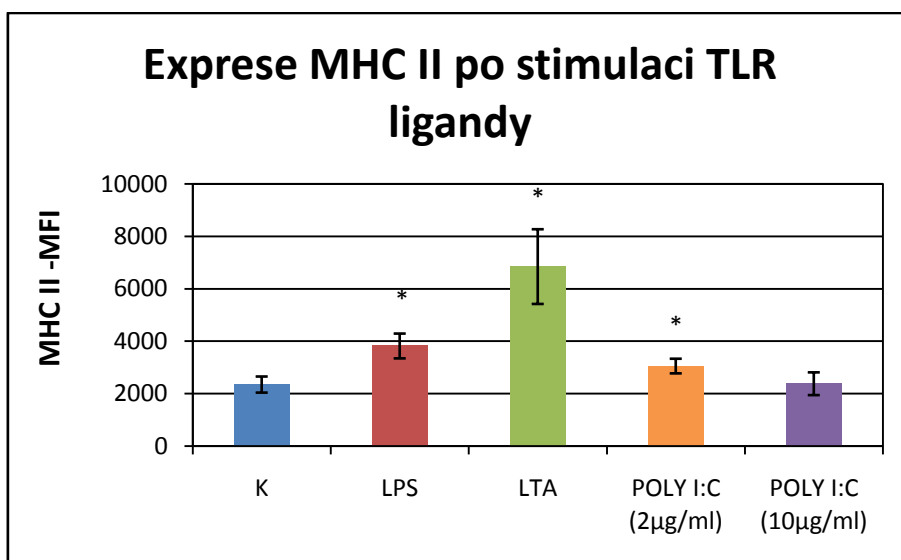
4. Výsledky

4.1 Pokus č. 1

Optimalizace metody, stimulace dendritických buněk TLR ligandy

Dendritické buňky získané derivací růstovým faktorem GM-CSF byly po založení do panelu stimulovány s jednotlivými TLR ligandy po dobu 24 hodin. Maturace DC byla vyhodnocována pomocí průtokové cytometrie měřením povrchové exprese molekul MHC II. Dva nezávislé pokusy prokázaly schopnost TLR ligandů aktivovat maturaci myeloidních dendritických buněk. Pouze u POLY I:C (10 µg/ml) a IQ (10 µg/ml) k této aktivaci nedocházelo, zřejmě kvůli příliš vysoké koncentraci ligandu, která působila na buňky toxicky.

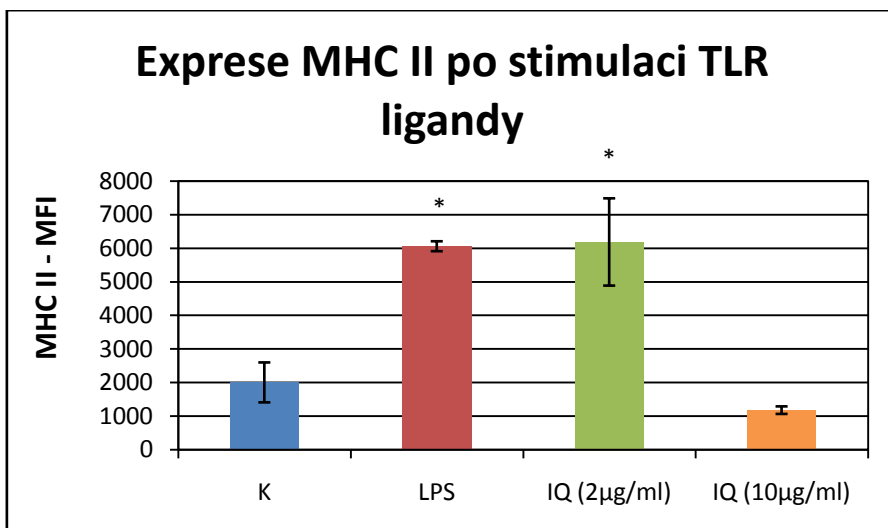
Obrázek č. 5 a č. 6 zobrazuje povrchovou expresi komplexu MHC II po stimulaci DC TLR ligandy. Z grafu je zřejmé, že aktivované buňky exprimují na povrchu více MHC II molekul, než buňky nestimulované.



Obr. 5: Vliv stimulace TLR ligandy na povrchovou expresi MHC II u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo ke kontrole (K)

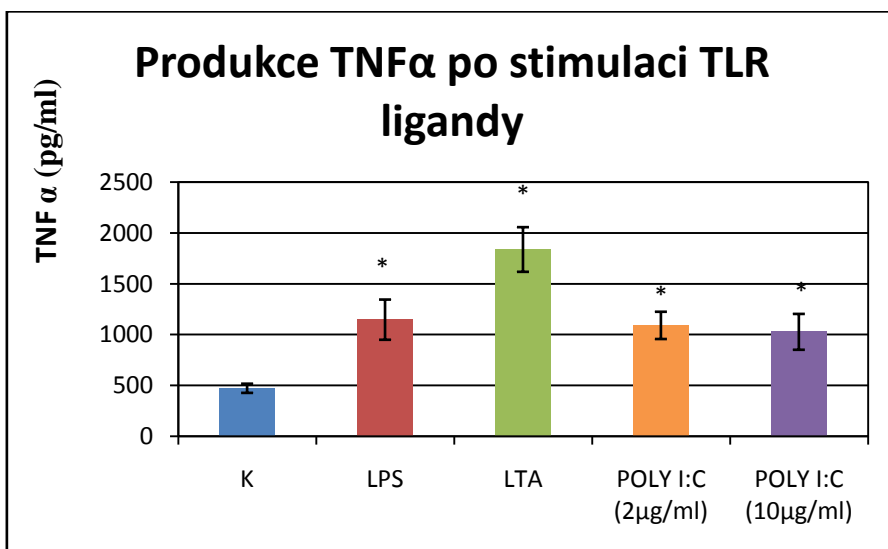


Obr. 6: Vliv stimulace TLR ligandy na povrchovou expresi MHC II u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

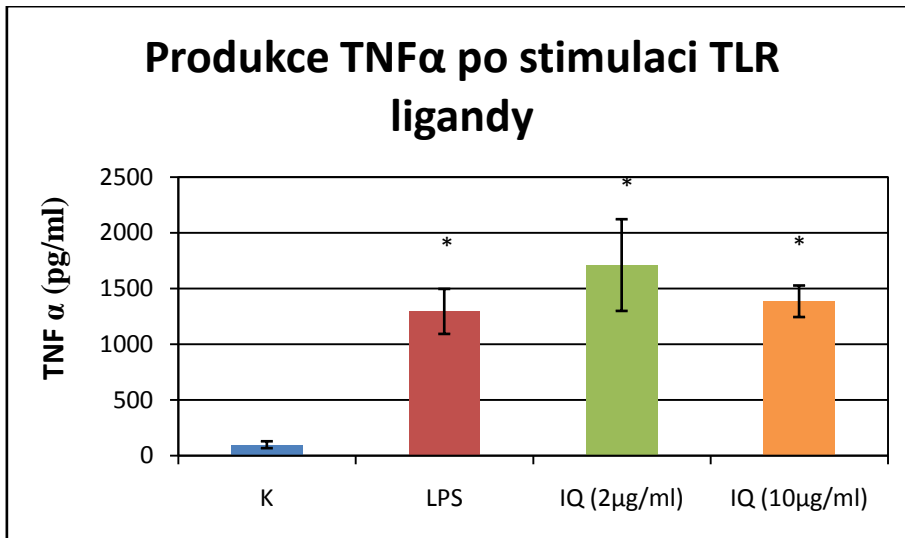
* = $P \leq 0,05$; vztaženo ke kontrole (K)

Kromě exprese MHC II molekul byl stanovena koncentrace TNF- α produkovaného aktivovanými buňkami (obrázek č. 7 a č. 8). Je zřejmé, že stimulace dendritických buněk TLR ligandy indukovala produkci TNF α .



Obr. 7: Produkce TNF α v DC po stimulaci TLR ligandy.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo ke kontrole (K)



Obr. 8: Produkce TNF α v DC po stimulaci TLR ligandy.

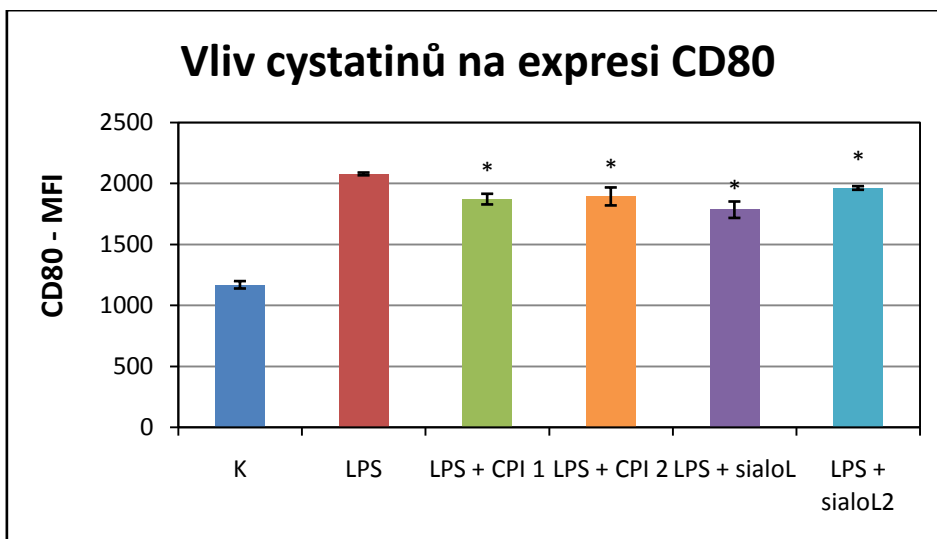
* = $P \leq 0,05$; vztaženo ke kontrole (K)

4.2 Pokus č. 2

Vliv klíčtějších cystatinů na LPS indukovanou maturaci dendritických buněk

Bylo prokázáno, že cystatin SialoL inhibuje LPS-indukovanou maturaci dendritických buněk (Kotsyfakis et al., 2006). Naším cílem bylo zjistit, zda podobně mohou působit i příbuzný cystatin SialoL2 z *I.Scapularis* a dva cystatiny CPI 1 a CPI 2 z *I.ricinus*. DC byly stimulovány LPS v přítomnosti jednotlivých 3μM cystatinů a byla měřena povrchová exprese CD80, CD86 a MHC II molekul. Taky byla stanovena koncentrace cytokinů TNF- α , IL-10 a IL-12.

Obrázek č. 9 zobrazuje vliv klíčtějších cystatinů na povrchovou expresi kostimulační molekuly CD80. Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 1, CPI 2 a sialostatiny L a L2 snižují expresi kostimulační molekuly CD80 u dendritických buněk stimulovaných LPS.

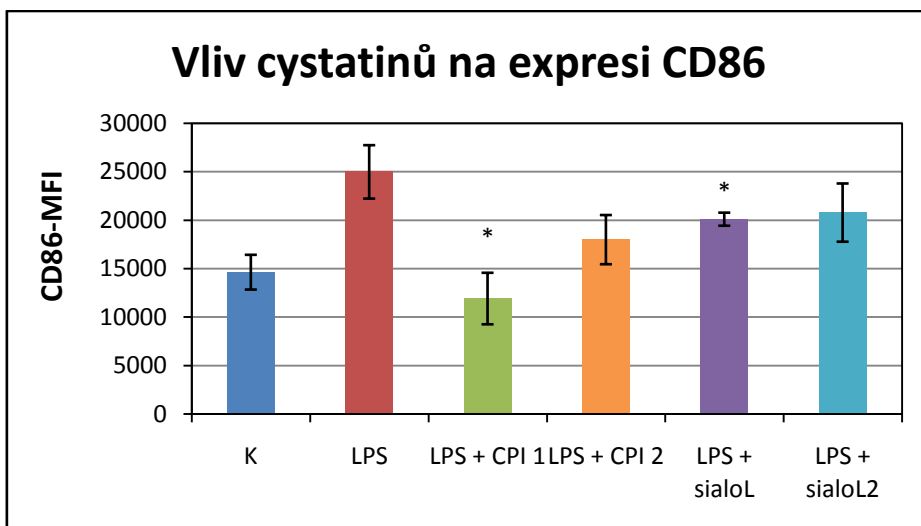


Obr. 9: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD80 po stimulaci s LPS u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LPS

Obrázek č. 10 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na povrchovou expresi kostimulační molekuly CD86. Z grafu vyplývá, že cystatiny CPI 1 a sialoL signifikantně snižují expresi CD86 u buněk stimulovaných LPS.

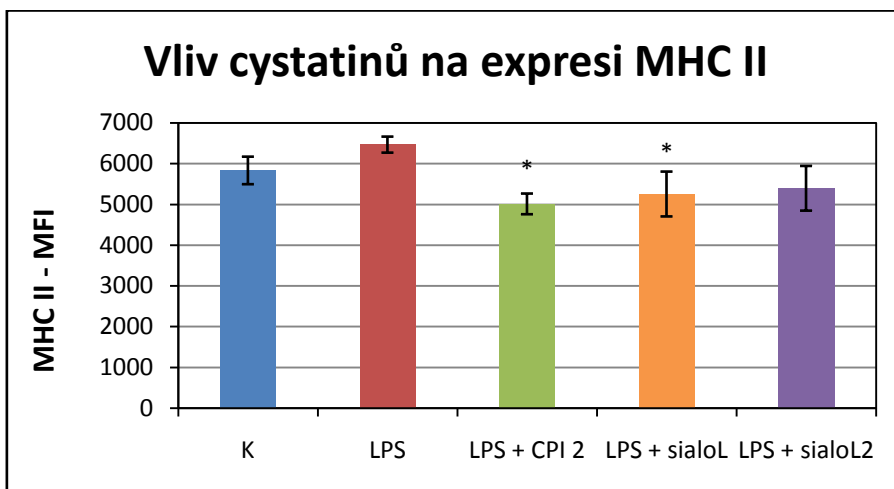


Obr. 10: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD86 po stimulaci s LPS u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LPS

Obrázek č. 11 zobrazuje vliv klíčtějších cystatinů na povrchovou expresi MHC II komplexu. Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 2 a sialostatin L signifikantně snižují expresi komplexu MHC II u buněk stimulovaných LPS.

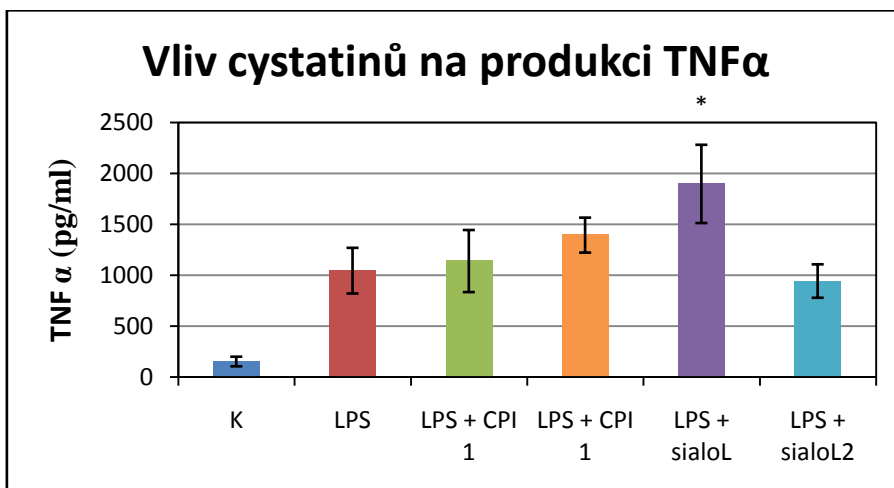


Obr. 11: Vliv klíčtějších cystatinů na expresi MHC II po stimulaci s LPS u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaheno k buňkám stimulovaným LPS

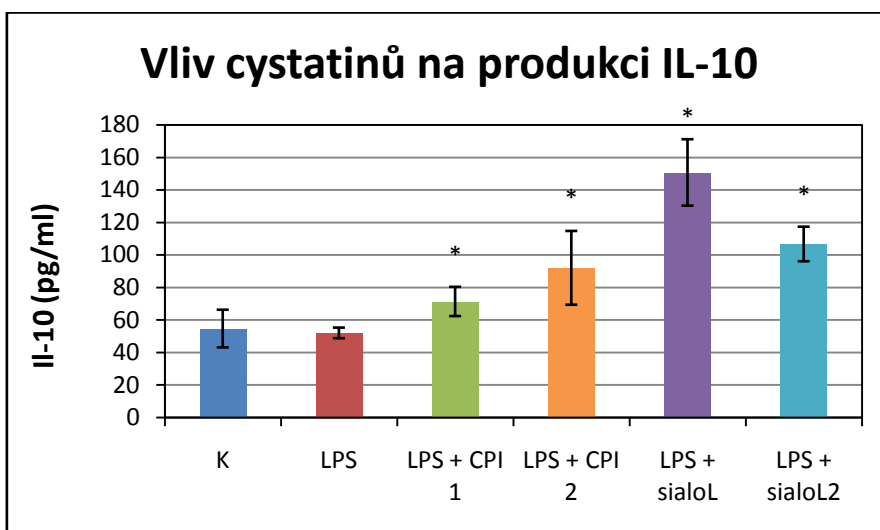
Obrázek č. 12 zobrazuje vliv klíčtějších cystatinů na produkci TNF α . Z grafu vyplývá, že cystatiny CPI 1, CPI 2 a sialostatin L2 nemají statisticky významný efekt na produkci TNF α , sialostatin L produkci TNF α u buněk stimulovaných LPS zvyšoval.



Obr. 12: Vliv klíčtějších cystatinů na produkci TNF α po stimulaci s LPS u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaheno k buňkám stimulovaným LPS

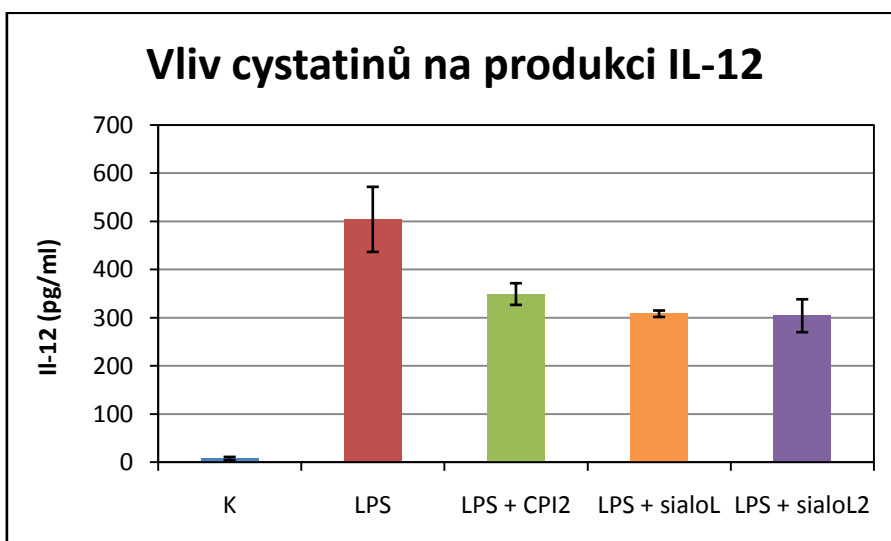
Vliv cystatinů na produkci protizánětlivého interleukinu 10 (IL-10) je prezentován na obrázku č. 13. Z grafu vyplývá, že cystatiny CPI 1 a CPI 2 a sialostatiny L a L2 zvyšují produkci IL-10.



Obr. 13: Vliv klíčových cystatinů na produkci IL-10 po stimulaci s LPS u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LPS

Dále byl v dendritických buňkách stimulovaných LPS také sledován vliv cystatinů na produkci prozánětlivého cytokinu - IL-12 (obrázek č. 14). Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 2, sialostatin L a sialostatin L2 produkci IL-12 snižují, avšak bez dosažení statistické signifikace.



Obr. 14: Vliv klíčových cystatinů na produkci IL-12 po stimulaci s LPS u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LPS

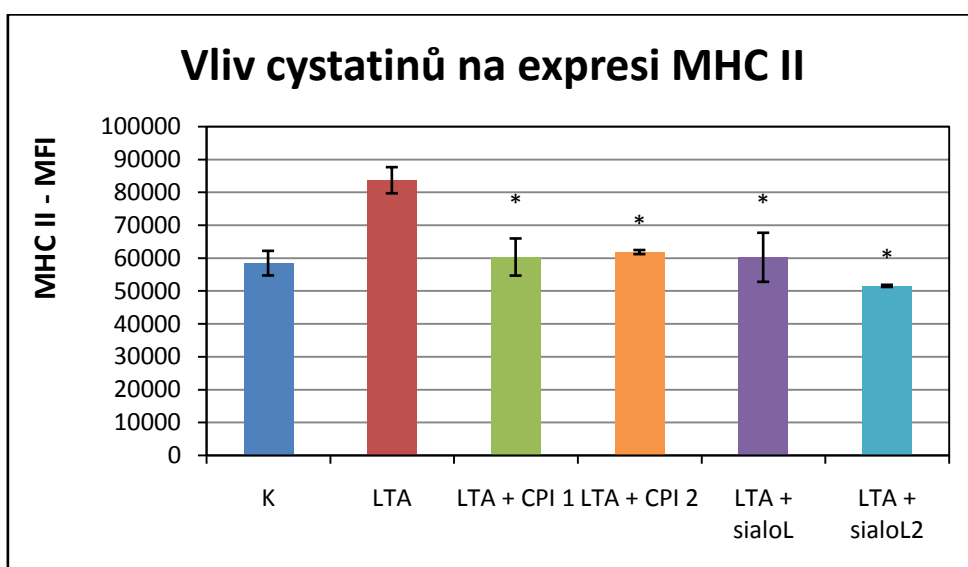
Pozorované efekty klíčících cystatinů byly dosaženy i při opakovaných experimentech a tím potvrzeny. U těchto opakování již nebyl použit cystatin CPI 1 z důvodu jeho nedostatku.

4.3 Pokus č. 3

Vliv klíčících cystatinů na LTA indukovanou maturaci dendritických buněk

Při sledování efektu cystatinů na LTA indukovanou maturaci jsme použili buňky derivované s GM-CSF a při opakování experimentu byly buňky navíc přečištěné od CD11c negativních buněk magnetickou separací. Jinak byl experiment proveden obdobným způsobem jako v pokusu č. 2.

Obrázek č. 15 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na povrchovou expresi MHC II komplexu. Je patrné, že v případě všech testovaných cystatinů bylo pozorováno snížení povrchové exprese komplexu MHC II u LTA stimulovaných DC.

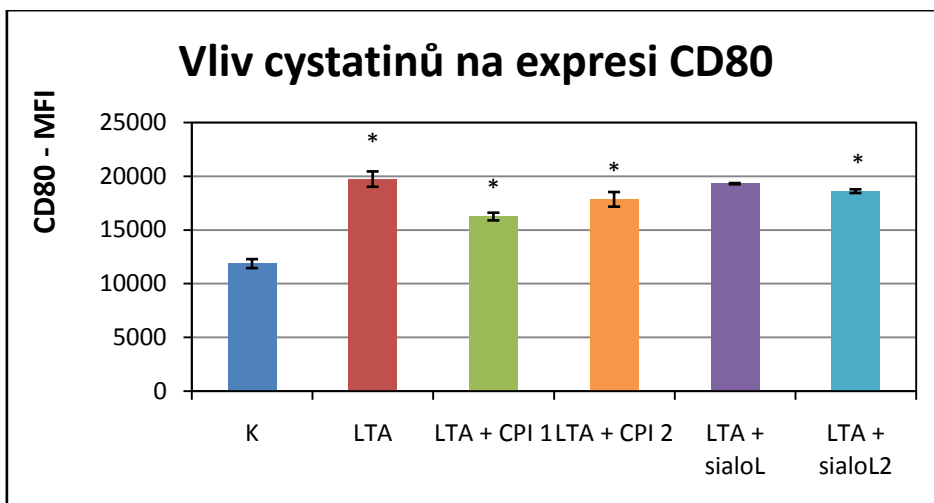


Obr. 15: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD80 po stimulaci LTA u CD11c pozitivních DC

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

Obrázek č. 16 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na povrchovou expresi kostimulační molekuly CD80. Z grafu vyplývá, že cystatiny CPI 1 a CPI 2 a sialostatin L2 signifikantně snižují expresi CD80 u buněk stimulovaných LTA. U sialostatinu L nebyl pozorován významný efekt.

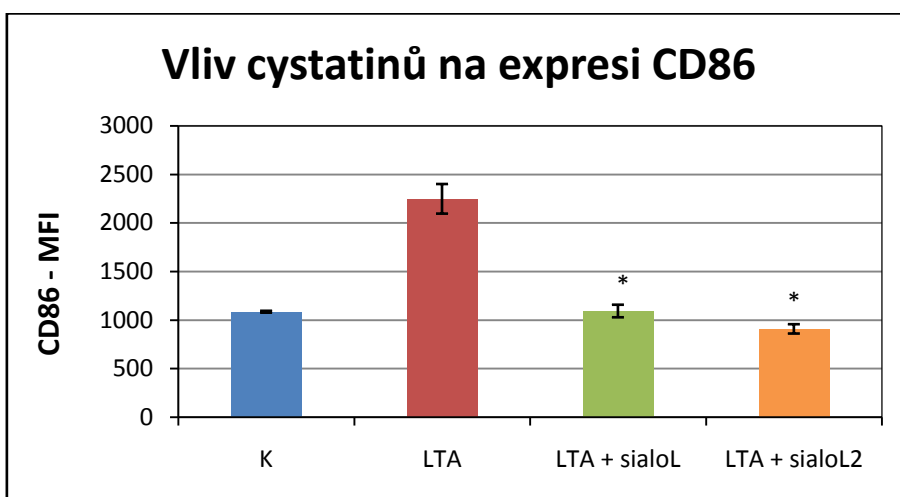


Obr. 16: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD80 po stimulaci LTA u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

Obrázek č. 17 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na CD86 z druhého (opakovaného) experimentu (buňky byly pročištěny na koloně). V něm byly testovány jenom cystatiny SialoL a SialoL2 a oba statisticky významně snížili expresi CD86. V prvním experimentu byla CD86 jenom mírně zvýšena po stimulaci s LTA, avšak cystatiny snížili její expresi jenom mírně a nesignifikantně (data neprezentována).

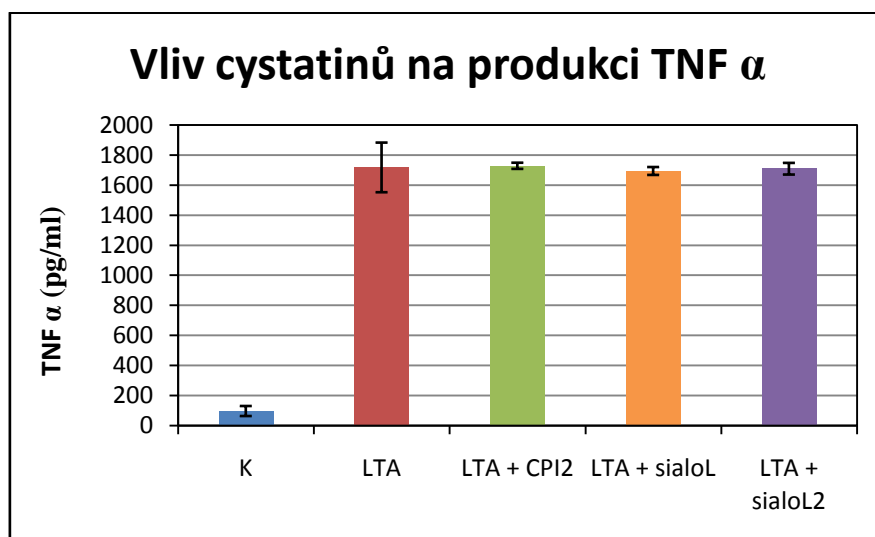


Obr. 17: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD86 po stimulaci LTA u CD11c pozitivních DC

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

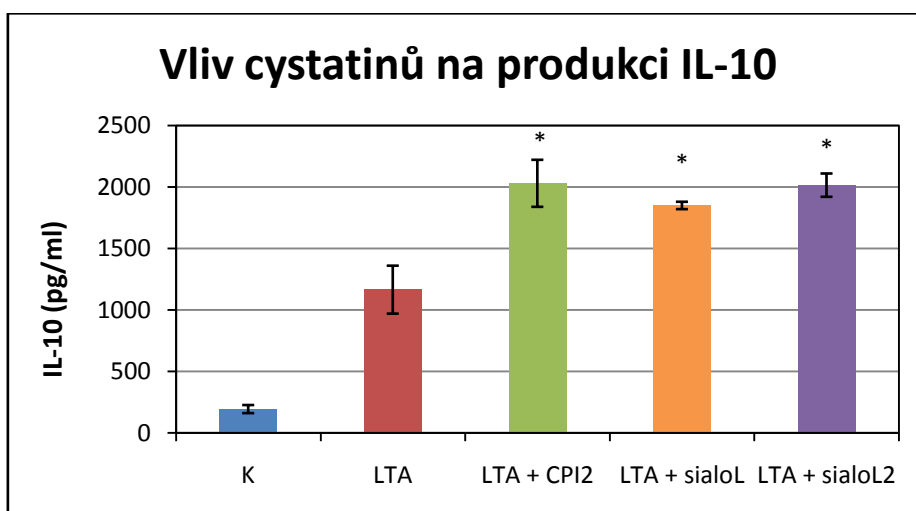
Podobně jako v předchozím experimentu byly stanoveny koncentrace cytokinu ze supernatantu LTA- aktivovaných DC. Obrázek č. 18 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na produkci TNF α . Z grafu vyplývá, že cystatiny CPI 2, sialostatiny L a L2 nemají na produkci TNF α vliv.



Obr. 18: Vliv klíčících cystatinů na produkci TNF α po stimulaci LTA u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

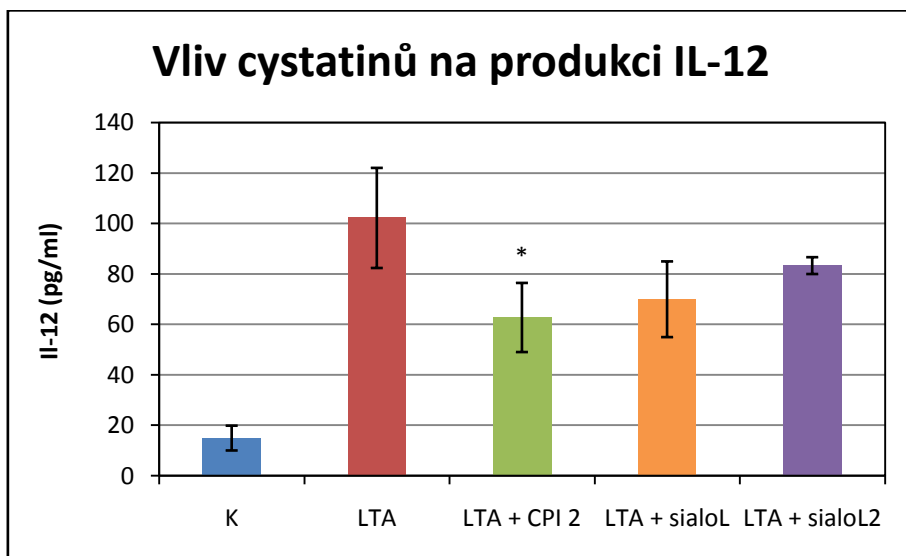
Obrázek č. 19 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na produkci protizánětlivého interleukinu 10 (IL-10). Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 2 a sialostatiny L a L2 signifikantně zvyšují produkci IL-10 u buněk stimulovaných LTA. Tento výsledek byl potvrzen opakováním.



Obr. 19: Vliv klíčících cystatinů na produkci IL-10 po stimulaci LTA u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

Obrázek č. 20 zobrazuje vliv klíštěcích cystatinů na produkci prozánětlivého interleukinu 12 (IL-12). Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 2, sialostatin L a sialostatin L2 produkci IL-12 snižují. Statistická významnost v případě SialoL a SialoL2 nebyla dosažena a ani opakované experimenty neprokázaly inhibiční efekt.



Obr. 20: Vliv klíštěcích cystatinů na produkci IL-12 po stimulaci LTA u DC.

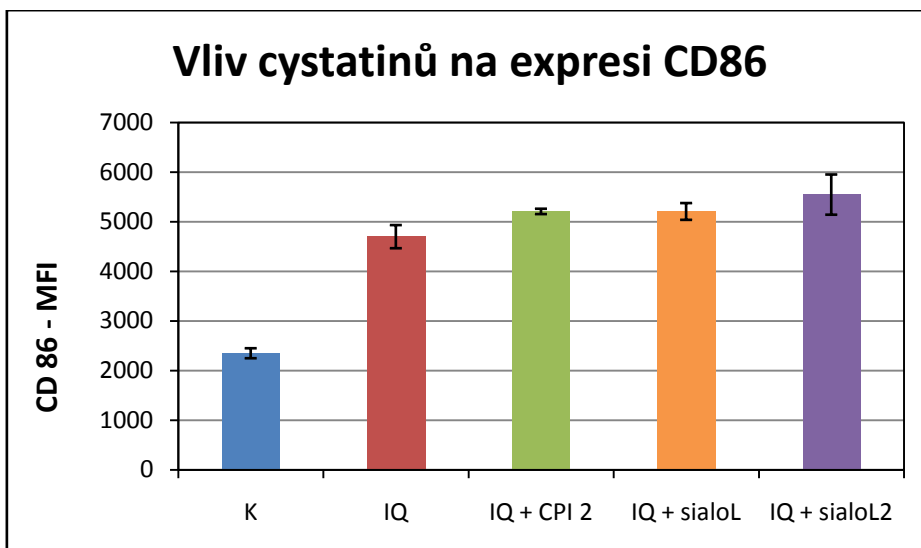
* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným LTA

4.4 Pokus č. 4

Vliv klíštěcích cystatinů na IQ indukovanou maturaci dendritických buněk

Podobně, jako v předchozích experimentech byl sledován vliv klíštěcích cystatinů na imiquimodem indukovanou aktivaci DC. Byly měřeny povrchové molekuly CD86 a MHC II a stanoveno množství naprodukovaných cytokinů.

Obrázek č. 21 zobrazuje vliv klíštěcích cystatinů na povrchovou expresi kostimulační molekuly CD86. Z grafu vyplývá, že cystatiny neměly na expresi žádný vliv.

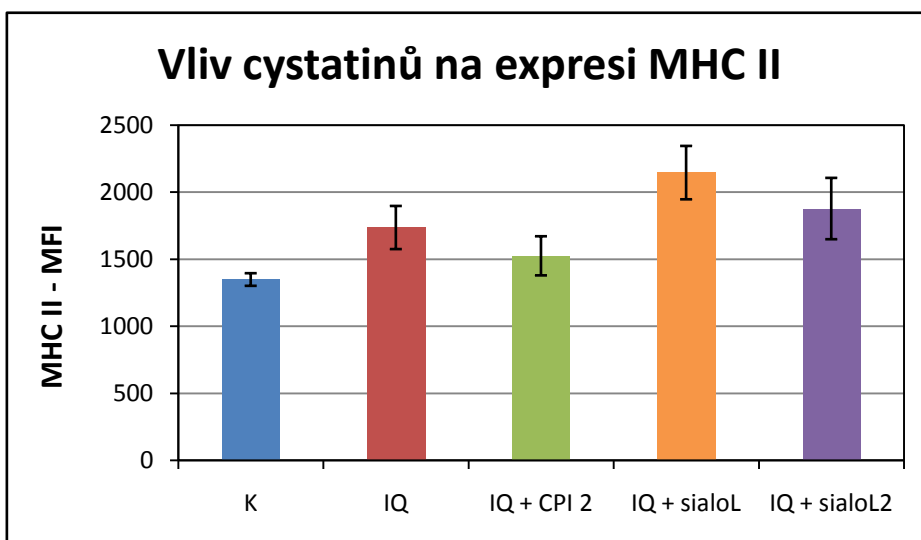


Obr. 21: Vliv klíčkových cystatinů na expresi CD86 po stimulaci IQ u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným IQ

Obdobně, vliv klíčkových cystatinů na povrchovou expresi MHC II komplexu po stimulaci s IQ nebyl pozorován (obrázek č. 22).

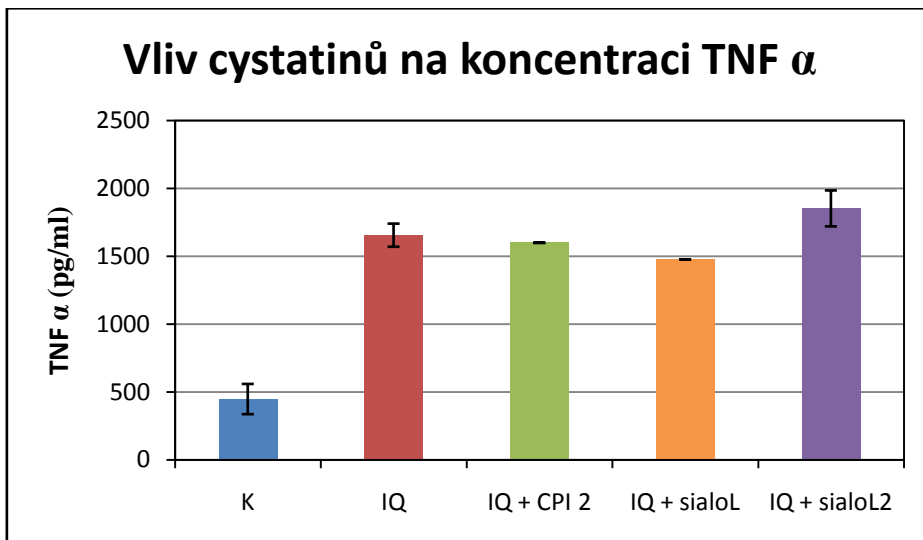


Obr. 22: Vliv klíčkových cystatinů na expresi MHC II po stimulaci IQ u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným IQ

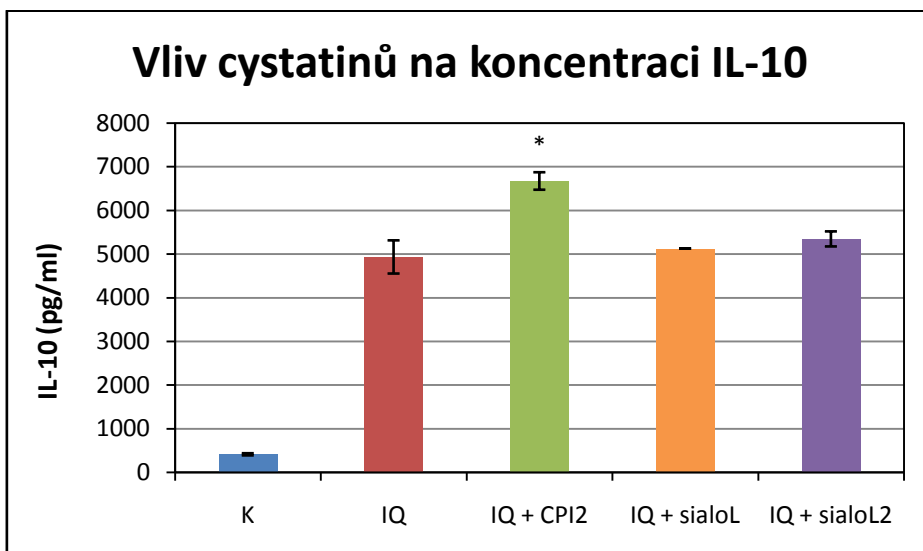
Obrázek č. 23 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na produkci TNF α . Z grafu vyplývá, že cystatiny neměly na produkci TNF α žádný vliv.



Obr. 23: Vliv klíčících cystatinů na produkci TNF α po stimulaci IQ u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným IQ

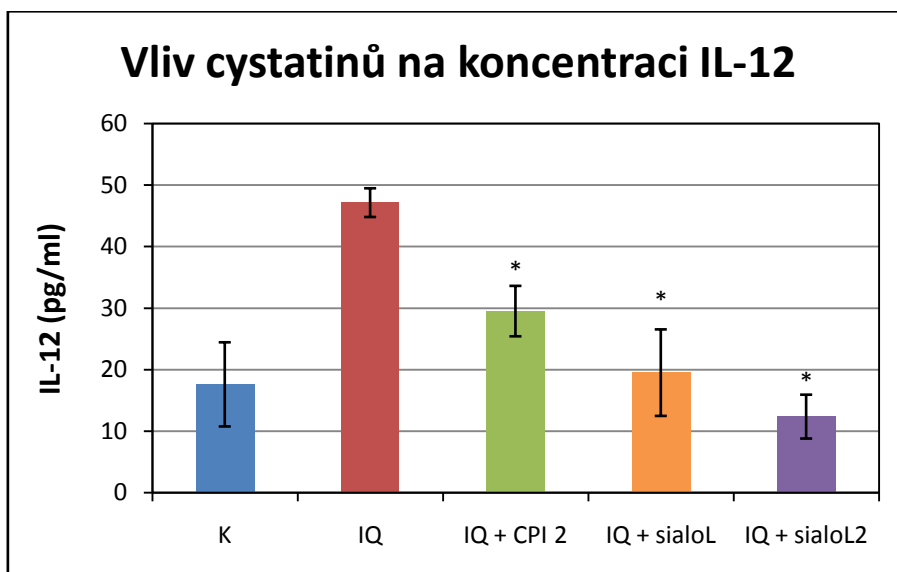
Obrázek č. 24 zobrazuje vliv klíčících cystatinů na produkci IL-10. Z grafu vyplývá, že cystatin CPI 2 signifikantně zvyšuje produkci IL-10 u buněk aktivovaných IQ, avšak sialostatin L ani sialostatin L2 tentokrát na produkci IL-10 neměly žádný efekt.



Obr. 24: Vliv klíčících cystatinů na produkci IL-10 po stimulaci IQ u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným IQ

Obrázek č. 25 zobrazuje vliv klíčtějších cystatinů na produkci IL-12. Cystatin CPI 2, sialostatin L a sialostatin L2 signifikantně snížily produkci IL-12 u buněk aktivovaných IQ.



Obr. 25: Vliv klíčtějších cystatinů na produkci IL-12 po stimulaci IQ u DC.

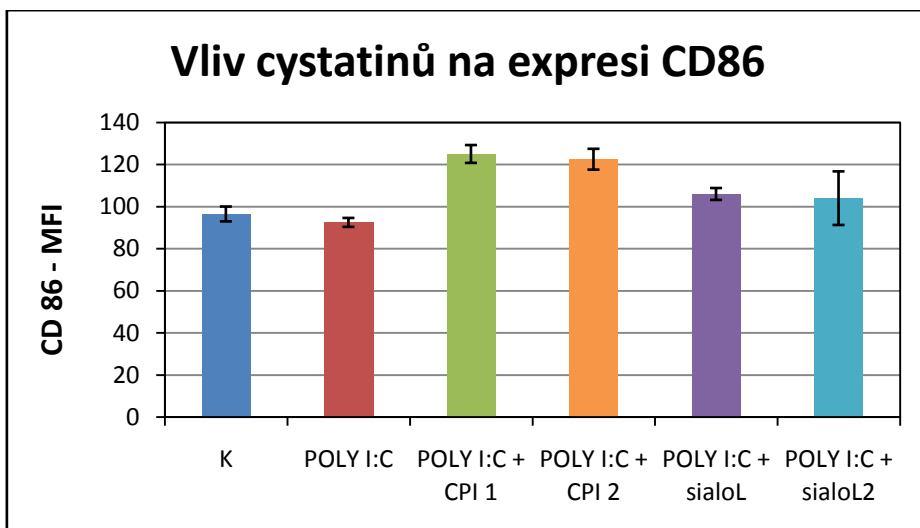
* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným IQ

Pokusy byly dvakrát zopakovány. Přesto, že žádného výrazného ovlivnění povrchové exprese CD86 a MHC II nebylo dosaženo, negativní vliv cystatinů na produkci IL-12 byl potvrzen.

4.5 Pokus č. 5

Vliv klíčtějších cystatinů na POLY I:C indukovanou maturaci dendritických buněk

Vliv klíčtějších cystatinů na povrchovou expresi kostimulační molekuly CD86 nebylo možné stanovit. Z grafu je patrné, že přidáním POLY I:C nedošlo ke zvýšení exprese CD86 (obrázek č. 26). Podobně tomu bylo v případě povrchové exprese MHC II.

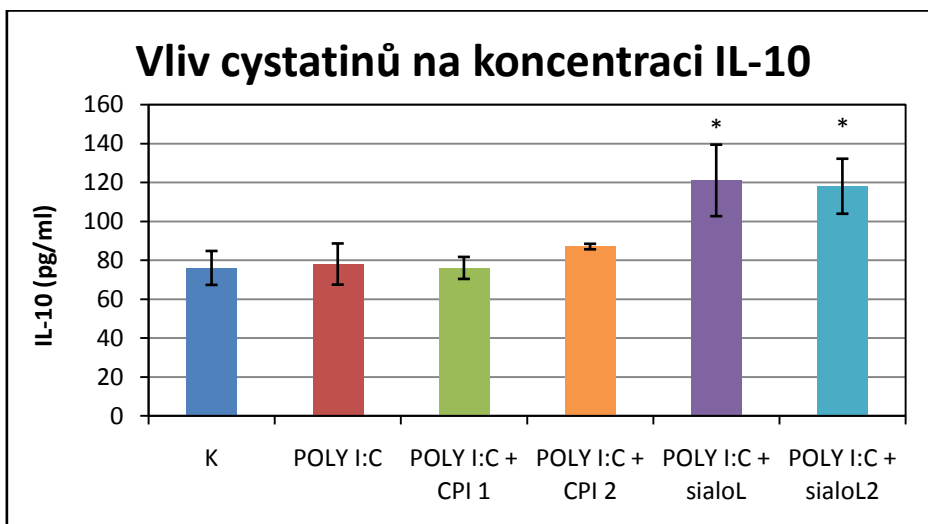


Obr. 26: Vliv klíčících cystatinů na expresi CD86 po stimulaci POLY I:C u CD11c pozitivních DC.

MFI - median fluorescence intensity

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným POLY I:C

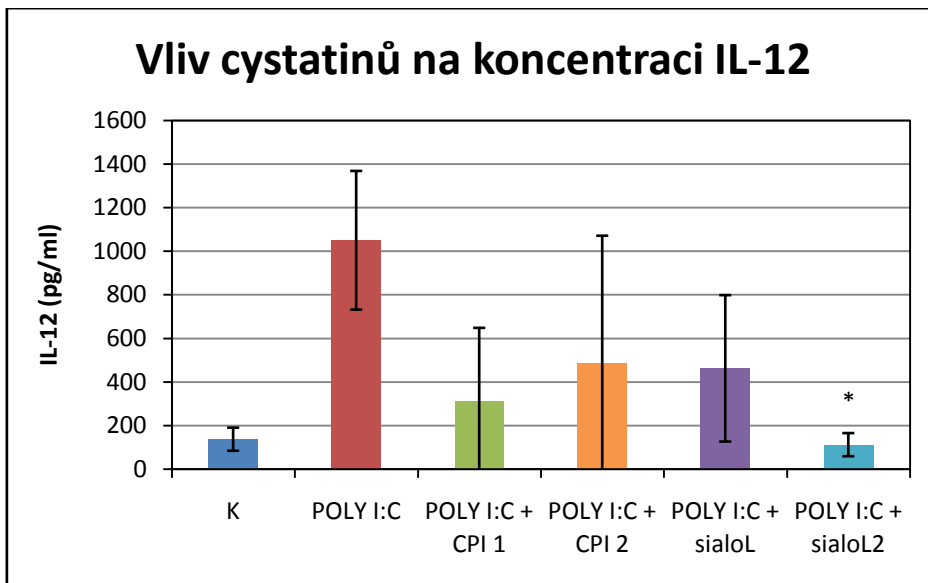
Co se týče produkce cytokinů, samotný POLY I:C nedokázal indukovat IL-10. Avšak množství IL-10 bylo signifikantně zvýšeno cystatiny SialoL a SialoL2 (obrázek č. 27).



Obr. 27: Vliv klíčících cystatinů na produkci IL-10 po stimulaci POLY I:C u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným POLY I:C

Koncentrace IL-12 byla po stimulaci POLY I:C zvýšena (Obrázek č. 28). Z testovaných cystatinů měl signifikantní negativní vliv na produkci IL-12 pouze sialoL2.



Obr. 28: Vliv klíččích cystatinů na produkci IL-12 po stimulaci POLY I:C u DC.

* = $P \leq 0,05$; vztaženo k buňkám stimulovaným POLY I:C

Pokusy testující vliv byly zopakovány, přesto cystatiny neměly na povrchovou expresi CD86 a MHC II žádný vliv. Stanovení koncentrací metodou ELISA proto opakováno nebylo.

5. Diskuze

Sání klíštěte je proces, k jehož úspěšnému završení, je nutné potlačení imunitní odpovědi hostitele a zabránění hemokoagulace. Dendritické buňky jsou důležitou součástí jak vrozené tak adaptivní imunity a jejich aktivace i funkce je ovlivňována v mnoha směrech klíštěcími slinami (Skallova et al., 2008).

Jedním z klíčových efektů, kterým molekuly obsažené v klíštěcích slinách potlačují imunitu hostitele, je suprese proliferace T buněk. Tuto supresi navíc doprovází downregulace cytokinů Th1 buněčné odpovědi, kterými jsou například IL-2 nebo IFN- γ (Ramachandra a Wikel, 1992). Na downregulaci Th1 odpovědi se podílí mnoho různých cytokinů. Příkladem je protizánětlivý interleukin 10 (IL-10). Naproti tomu, interleukin 12 (IL-12) působí v organismu prozánětlivě, stimuluje Th1 odpověď a podílí se na inhibici Th2 odpovědi.

Cílem této práce bylo otestovat jestli cystatiny CPI 1 a CPI 2 z *I. ricinus* a sialostatinu L a sialostatinu L2 z *I. scapularis* ovlivňují funkci DC. Konkrétně byla měřena maturace myších myeloidních dendritických buněk po stimulaci s různými TLR ligandy. Naše experimenty ukázaly, že povrchová exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, podobně jako exprese MHC II byly v přítomnosti testovaných cystatinů sníženy.

Glykoproteiny MHC II jsou exprimovány především na povrchu antigen prezentujících buněk. Na MHC II se váží antigenní peptidy, vzniklé endocytózou antigenu antigen prezentujícími buňkami. Tyto peptidy jsou následně prezentovány T lymfocytům za účelem vyvolání T buněčné imunitní odpovědi. Čím více molekul MHC II antigen prezentující buňky na svém povrchu exprimují, tím silnější a rozsáhlejší je aktivace T lymfocytů. K aktivaci T lymfocytů jsou nezbytné i kostimulační signály, které zabezpečují kostimulační molekuly CD80 a CD86 (exprimovány na povrchu antigen prezentujících buněk) vazbou na CD28 molekuly T lymfocytů. Exprese CD80 a CD86 se po aktivaci dendritických buněk zvyšuje (Trombetta a Mellman, 2005).

Pozorování, že cystatiny inhibovaly povrchovou expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86, naznačuje, že maturace myeloidních dendritických buněk indukovaná TLR-ligandy je klíštěcími cystatiny inhibována. To znamená, že takto nezralé dendritické buňky by nebyly schopny vysílat kostimulační signály nezbytné pro aktivaci T lymfocytů.

Účinky sialostatinu L na LPS indukovanou maturaci byly již publikovány (Sa-Nunes et al., 2009) (jako jediného z testovaných cystatinů) a shodují se s námi dosaženými výsledky. Navíc, inhibiční účinek byl našimi experimenty prokázán i v případech, kdy byla maturace vyvolána jinými TLR ligandy.

Kromě exprese kositulačních molekul a MHC II byly stanovovány koncentrace cytokinů produkovaných po aktivaci ligandy. V případě produkce prozánětlivého cytokinu IL-12 došlo ke snížení, které bylo pozorováno, opět ve všech případech. Ovšem, i když pokles byl pozorován opakovaně, ne vždy dosáhl statistické významnosti.

Naproti tomu, produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 byla signifikantně zvýšena po stimulaci s LPS i s LTA. I když aktivace s IQ ani s POLY IC nevyvolala indukci IL-10, v přítomnosti cystatinu se produkce významně zvýšila. Zajímavé je, že po stimulaci s LPS žádné zvýšení v přítomnosti cystatinu L pozorováno nebylo (Sa-Nunes, 2009). Zvýšená produkce IL-10 je známkou regulačních DC. Ty jsou charakteristické nadprodukcí IL-10, a sníženou produkcí IL-12 (Oliveira et al., 2009). Produkce TNF- α po 24 hodinách ovlivněna cystatiny nebyla. Kratší časový interval by byl pravděpodobně vhodnější pro detekci tohoto cytokinu.

Bylo tedy prokázáno, že cystatiny významně zvyšovaly produkci protizánětlivého IL-10 a naopak snižovaly produkci prozánětlivého IL-12, což může být způsob, jakým klíšťata modulují imunitu hostitele a mírní zánětlivou reakci v místě sání. Zdá se, že cystatiny přispívají k polarizaci imunitní odpovědi k Th2, což je jev často pozorovaný u různých druhů klíšťat (Zeidner et al., 1997). Tlumení zánětlivé reakce a polarizace imunitní odpovědi k Th2 usnadňuje klíšťatům sání a podporuje i přenos patogenů.

Cystatiny nebyly nalezeny jen u klíšťat. Poprvé byly objeveny u ploštic rodu *Triatoma*. Struktura jejich aminokyselinové sekvence je řadí mezi cystatiny typu 2. Bylo prokázáno, že tigutcystatin u ploštic *Triatoma infestans* byl silně upregulován při infekci prvokem *Trypanosoma cruzi*, původcem Shagasovy choroby. Ploštice rodu *Triatoma* využívají katepsinů pro rozklad proteinů v zadní části střeva (Kollien a Schaub, 2000). Tigutcystatin se proto pravděpodobně účastní regulace endogenních cysteinových proteáz v žaludku ploštic, čímž kontroluje nechtěnou proteolýzu. Mimo to by mohl mít defenzivní účinek vůči cysteinové proteáze prvoka *Trypanosoma cruzi*, známé jako cruzipain, která je zodpovědná za průnik parazita do hostitelských buněk (Buarque et al., 2011).

Sialostatin L je účinným inhibítorem katepsinu L a papainu, avšak neinhibuje žádnou z cysteinových proteáz typu C1. Sialostatin L inhibuje navíc i katepsin S, na rozdíl od sialostatinu L2, který je velice slabým inhibítorem katepsinu S (Kotsyfakis et al., 2010). Vysoce selektivní lidský cystatin C inhibuje katepsiny B, H, L a S, avšak mnohem slaběji (Hall et al., 1998). Sialostatin L a sialostatin L2 si jsou velmi podobné, co se týče aminokyselinové sekvence, avšak jejich krystalická struktura vykazuje výrazné rozdíly. Sialostatin L se strukturně podobá ostatním cystatinům zejména tím, že tvoří dimery. Rozdíly mezi sialostatinem L a L2 jsou patrné zejména v oblasti N-konce, kde se sialostatin L2 ohýbá přes strukturu β -skládaného listu, zatímco sialostatin L ne. Právě silný negativní elektrický náboj této oblasti odlišuje sialostatin L2 od sialostatinu L a může být zodpovědný za jeho unikátní vlastnosti, co se týče přenosu patogenů. Odstranění N-konce sialostatinu L2 mělo velice dramatické následky. Sialostatin L2 ztrácel schopnost inhibovat katepsiny L a S, zato dokázal dobře inhibovat katepsin C (Kotsyfakis et al., 2010).

Kromě usnadnění sání klíštěte se látky obsažené v klíštěcích slinách výrazně podílejí i na přenosu různých patogenů, mezi které patří i původce lymské nemoci *Borrelia burgdorferi* (Rupprecht et al., 2008). Bylo prokázáno, že se na procesu přenosu a množení bakterií podílí zejména sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2010), ačkoliv dosud není známo, jakým mechanismem. Výzkum látek obsažených v klíštěcích slinách, včetně cystatinů, je důležitý zejména v rámci vytvoření vakcíny proti lymské nemoci.

Jak už bylo zmíněno, sialostatin L inhibuje katepsin S. Existují práce, popisující souvislost mezi katepsinem S a autoimunitními onemocněními (Saegusa et al., 2002). Farmaceutické společnosti již testují inhibitory katepsinu S jako nové možné léky na různá autoimunitní onemocnění (Gupta et al., 2008). Studie publikována v roce 2009 ukázala, že sialostatin L významně snižoval symptomy experimentálně navozené encefalomyelitidy u myší, a má tedy potenciál interferovat s autoimunitou (Sa-Nunes et al., 2009). Kromě toho, Sialostatin L signifikantně potlačuje symptomy astmatu vyvolané zvýšenou produkcí interleukinu IL-9 *in vivo* (Horká et al., 2012). Testování efektu klíštěcích molekul /inhibitorů na jednotlivé imunitní buňky může vést k objevení účinků, které mohou být potenciálně využitelné ve farmakologickém průmyslu.

6. Závěr

- **Bylo prokázáno, že klíčící cystatiny CPI 1, CPI 2, sialostatin L a sialostatin L2 mají inhibiční efekt na TLR ligandy indukovanou maturaci myeloidních dendritických buněk.**

7. Seznam zkratek

APC - antigen prezentující buňka

BMDC - dendritická buňka z kostní dřeně

BOFES - fetální hovězí séru

CCR7 - C-C chemokinový receptor typu 7

CD (př. CD80) - cluster of differentiation, povrchový marker

CLRs - lectin-like receptory typu C

CPI - inhibitor cysteinových proteáz

DC - dendritická buňka

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELISA - enzymatická imunosorbentní assay

GM-CSF - růstový faktor stimulující granulocyty a makrofágy

IFN - interferon

IL (př. IL-10) - interleukin

IQ - imiquimod

IRAK - kináza spojená s interleukinovým receptorem 1

IRF 3 - interferon regulační faktor 3

LPS - lipopolysacharid

LTA - lipoteichonická kyselina

MAP-kináza - mitogeny aktivovaná proteinová kináza

MHC II - hlavní histokompatibilní komplex II, povrchové glykoproteiny

MEM - minimální esenciální médium

MyD88 - Myeloid differentiation primary response protein 88

NH₄Cl - chlorid amonný

NK buňky - natural killer, "zabíječské" buňky

NLRs - Nod-like receptory

PBS - fosfátový pufr

PAMPs - vzory patogenity

POLY I:C - Polyinosinická:polycytidylická kyselina

PRRs - vzory rozpoznávající receptory

RLRs - RIG-I like receptory

RNA - ribonukleová kyselina

TBK1 - TANK-vázající kináza 1, serinová/ threoninová proteinová kináza

TIR - Toll/IL-1R homologní doména

TIRAP - toll-interleukin 1 receptor adaptorový protein obsahující TIR doménu

TLR - Toll-like receptor

TNF - tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy

TRAF6 - factor 6 spojený s TNF receptorem

TRAM - adaptorová molekula spojená s TRIF

TRIF - TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

8. Literatura

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801
- Anatriello E, Ribeiro JMC, de Miranda-Santos IKF, Brandão LG, Anderson JM, Valenzuela JG, Maruyama SR, Silva JS, Ferreira BR (2010): An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*, 11, 450
- Anderson JM, Sonenshine DE, Valenzuela JG (2008): Exploring the midgut of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics*, 9, 552
- Brown WM, Dziegielewska KM (1997): Friends and relations of the cystatin superfamily – new members and their evolution. *Protein Science*, 6, 5–12
- Brzin J, Kopitar M, Turk V, Machleidt W (1983): Protein inhibitors of cysteine proteinases. I. Isolation and characterization of stefin, a cytosolic protein inhibitor of cysteine proteinases from human polymorphonuclear granulocytes. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 364, 1475–1480
- Buarque DS, Spindola LM, Martins RM, Braz GR, Tanaka AS (2011): Tigutcystatin, a cysteine protease inhibitor from *Triatoma infestans* midgut expressed in response to *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413, 241-247
- Cao W, Liu YJ (2007): Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 19, 24-30
- Chuang T, Ulevitch RJ (2001): Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1518, 157-161
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 1529-1531
- Doan, Thao (2008): Immunology, *Lippincott Williams & Wilkins*.
- Fossum K, Whitaker JR (1968): Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 367–375

Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC (2009): The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2051-2088

Garg R, Juncadella IJ, Ramamoorthi N, Ashish, Ananthanarayanan SK, Thomas V, Rincón M, Krueger JK, Fikrig E, Yengo CM, Anguita J (2006): Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *Journal of Immunology*, 177, 6579-6583

Geijtenbeek TB, den Dunnen J, Gringhuis SI (2009): Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiology*, 4, 879-890

Gupta S, Singh RK, Dastidar S, Ray A (2008): Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12, 291-299

Hall A, Ekiel I, Mason RW, Kasprzykowski F, Grubb A, Abrahamson M (1998): Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D. *Biochemistry*, 37, 4071-4079

Hayashi F, Smith KD, Ozinski A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirsching C, Akira S (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-1529

Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO (2003): Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling, *Nature*, 424, 743-748

Honey K, Rudensky AY (2003): Lysozomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Reviews. Immunology*, 3, 472-482

Horka H, Staudt V, Klein M, Taube CH, Reuter S, Dehzad N, Andersen JF, Kopecky J, Schild H, Kotsyfakis M, Hoffmann M, Gerlitzki B, Stassen M, Bopp T, Schmitt E (2012): The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine interleukin-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *Journal of Immunology*, 188, 2669-2676

Hovius JW, Ramamoorthi N, Van't Veer C, de Groot KA, Nijhof AM, Jongejan F, van Dam AP, Fikrig E (2007): Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, (Larchmont, N.Y.), 7, 296-303

Hovius JW¹, de Jong MA, den Dunnen J, Litjens M, Fikrig E, van der Poll T, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB (2008): Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathogens*, 4, 31

Hsing LC, Rudensky AY (2005): The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews*, 207, 229–241

Kollien AH, Schaub GA (2000): The development of *Trypanosoma cruzi* in *triatominae*. *Parasitology Today*, 16, 381-387

Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IMB, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JMC (2006): Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 26298-26307

Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2007): Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29256 – 29263

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

Lewis KL, Reizis B (2012): Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a007401

Lima CA, Sasaki SD, Tanaka AS (2006): Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347, 44–50.

Manicassamy S, Pulendran B (2009): Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 21, 185-193

- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW (2003): The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1158–1167
- Mans BJ, de Klerk D, Pienaar R, Latif AA (2011): *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS One*, 6, 23675
- McCluskie MJ, Krieg AM (2006): Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 311, 155-178
- Medzhitov R, Janeway Jr.C (2000): Innate immunity recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89-97
- Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, Nuttall PA (2005): Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Immunology*, 174, 2084–2091
- Oliveira CJ, Carvalho WA, Garcia GR, Gutierrez FR, de Miranda Santos IK, Silva JS, Ferreira BR (2009): Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. *Veterinary Parasitology*, 167, 288-297
- Ramachandra RN, Wikel SK (1992): Modulation of host-immune responses by ticks (*Acari: Ixodidae*): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of Medical Entomology*, 29, 818–826
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 463, 573-577
- Rawlings ND, Barrett AJ (1990): Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 30, 60–71
- Rego RO, Hajdusek O, Kovar V, Kopacek P, Grubhoffer L, Hyspa V (2005): Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 991-1004

Ribeiro JM, Andersen J, Silva-Neto MA, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG (2004): Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 61–79

Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK (2006): An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 111–129

Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW (2008): The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Molecular Medicine*, 14, 205–212.

Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Arakaki R, Ogawa K, Saito I, Katunuma N, Hayashi Y (2002): Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 361–369

Sa-Nunes A, Bafica A, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM, Francischetti IM (2007): Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *Journal of Immunology*, 179, 1497-1505

Sa-Nunes A, Bafica A, Antonelli LR, Choi EY, Francischetti IM, Andersen JF, Shi GP, Chavakis T, Ribeiro JM, Kotsyfakis M (2009): The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *Journal of Immunology*, 182, 7422–7429

Scharfstein J, Schmitz V, Svensjö E, Granato A, Monteiro AC (2007): Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 128–136

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

Steinman RM (2008): Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29, 319-324

Su Y, Huang X, Raskovalova T, Zacharia L, Lokshin A, Jackson E, Gorelik E (2008): Cooperation of adenosine and prostaglandin E2 (PGE2) in amplification of cAMP-PKA

signaling and immunosuppression. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 57, 1611-1623

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

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11, 443-451

Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S (1999): TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*, 231, 56-65

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002): Cutting edge: Role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology*, 169, 10-14

Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK (1997): Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunological Reviews*, 156, 39-52

Trombetta ES, Mellman I (2005): Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, 23, 975-1028

Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC (2002): Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology*, 205, 2843-2864

Wang H, Paesen GC, Nuttall PA, Barbour AG (1998): Male ticks help their mates to feed. *Nature*, 391, 753-754

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003): Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301, 640-643

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005): TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308, 1626-1629

Zeidner N, Mbow ML, Dolan M, Massung R, Baca E, Piesman J (1997): Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infection and Immunology*, 65, 3100-3106

Zhou J, Ueda M, Umemiya R, Battsetseg B, Boldbaatar D, Xuan X, Fujisaki K (2006): A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 527–535