

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Interakce viru klíšťové encefalitidy s myšními keratinocyty

Diplomová práce

Bc. Kristina Kocarová

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

České Budějovice, 2021

Kocarová, K., 2021: Interakce viru klíš'ové encefalitidy s myšími keratinocyty. [The interaction of tick-borne encephalitis virus with mouse keratinocytes. Mgr. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis was focused on the infection of mouse keratinocytes with tick borne encephalitis. We examined the amount of virus in keratinocytes in different time points and we determined the influence of tick saliva derived from *Ixodes ricinus* on the infection.

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.....

.....

Bc. Kristina Kocarová

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za jeho cenné rady, za veškerou pomoc v laboratoři a za jeho trpělivost během psaní této práce. Velký dík taktéž patří mé školitelce specialiste Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala Ing. Evě Výletové za její ochotu a přípravu potřebných věcí k pokusům, kdykoliv jsme potřebovali, Mgr. Zuzaně Beránkové, která nám několikrát zapůjčila různé materiály a vždy nám byla nápomocná a RNDr. Martinovi Selingerovi, Ph.D., který nám velmi pomohl s imunofluorescencí. Nakonec bych ráda poděkovala svým rodičům, manželovi a svojí kamarádce Aničce, které nikdy nepřestanu být vděčná za vše, co pro mě během celého studia udělala.

Obsah

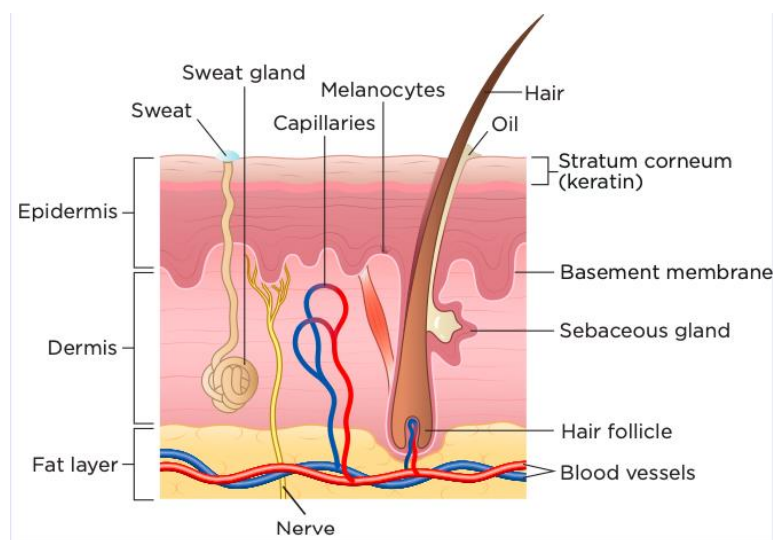
1	ÚVOD	1
1.1	KŮŽE	1
1.1.1	<i>Stavba kůže</i>	1
1.1.2	<i>Keratinocyty</i>	2
1.1.3	<i>Imunitní odpověď kůže</i>	4
1.2	VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY (TBEV)	8
1.2.1	<i>Taxonomie</i>	8
1.2.2	<i>Struktura TBEV</i>	8
1.2.3	<i>Replikace TBEV</i>	9
1.2.4	<i>Přenos TBEV</i>	10
1.2.5	<i>Příznaky TBE</i>	14
1.3	INTERAKCE VIRŮ S KERATINOCYTY	15
1.3.1	<i>Interakce flavivirů s keratinocyty</i>	15
2	CÍLE PRÁCE	17
3	MATERIÁL A METODY	18
3.1	MATERIÁL	18
3.1.1	<i>Myši</i>	18
3.1.2	<i>Primární kultura</i>	18
3.1.3	<i>Buněčná linie</i>	18
3.1.4	<i>Virus klíšťové encefalitidy</i>	18
3.1.5	<i>Klíštěcí sliny</i>	18
3.2	METODY	19
3.2.1	<i>Příprava primární kultury keratinocytů</i>	19
3.2.2	<i>Infekce keratinocytů</i>	20
3.2.3	<i>Plaková titrace</i>	20
3.2.4	<i>Imunofluorescence</i>	21
4	VÝSLEDKY	23
4.1	DETEKCE VIRU METODOU IFAT V KERATINOCYTECH	23
4.2	REPLIKACE VIRU TBEV V KERATINOCYTECH	26
4.2.1	<i>Vliv klíšťecích slin na replikace TBEV v keratinocytech</i>	27
5	DISKUZE	29
6	ZÁVĚR	33
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	34
8	SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ	36
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1 ÚVOD

1.1 KŮŽE

Kůže patří mezi největší a nejdůležitější orgány lidského těla, jelikož mimo jiné poskytuje důležitou bariéru mezi tělem a prostředím a zabraňuje tak vyšším ztrátám vody a pronikání potenciálně škodlivých environmentálních látek a mikroorganismů. Kromě dobře charakterizované mechanické bariérové funkce tvoří kůže aktivní bariéru, která poskytuje první linii imunologické obrany proti infekci (Bailey et al., 2014; Pasparakis et al., 2014).

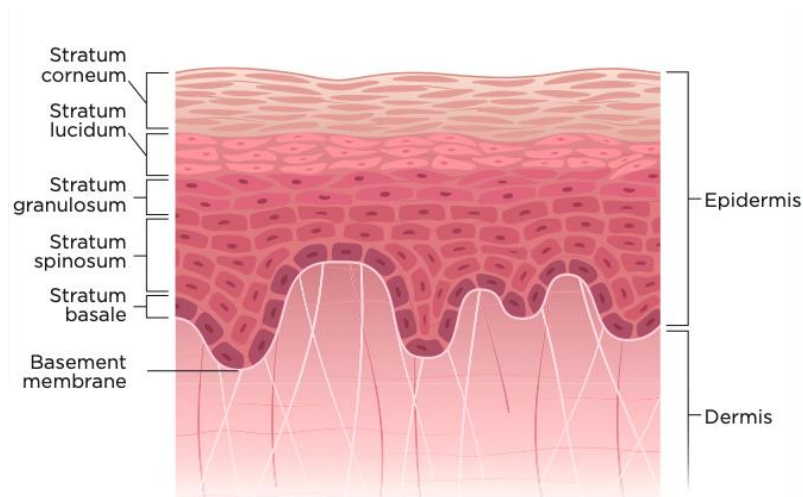
1.1.1 Stavba kůže



Obr 1: Stavba kůže (Lawton, 2019).

Kůže se skládá z několika vrstev (Obr. 1). Vnější vrstva kůže se nazývá *epidermis* a je zcela avaskulární. Z toho důvodu je závislá na dermis, která ji skrz bazální membránu zajišťuje výživu a odvádí odpadní látky. Epidermis je tvořena z 95 % keratinocyty, zbylých 5 % představují další buněčné struktury jako melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Hlavní funkcí epidermis je vytvářet bariéru před vnějšími faktory, zabránit ztrátě vody a udržet homeostázu.

Epidermis je složena ve většině částí těla ze 4 vrstev: stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum a stratum basale. V místech, kde se vyskytuje nejtenčí kůže lidského těla, je ještě navíc 5. vrstva, a to stratum lucidum (Obr. 2) (Lawton, 2019).



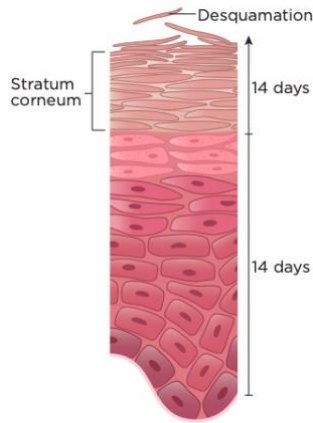
Obr. 2: Stavba epidermis (Lawton, 2019)

Vnitřní vrstva kůže se nazývá dermis a je od epidermis oddělena bazální membránou. Mezi její funkce patří podpora epidermis, ochrana vnitřních vrstev kůže před mechanickým poraněním a také se podílí na procesu hojení ran. Hlavní stavební buňky dermis jsou fibroblasty a hlavní pojivovou tkání je kolagen společně s elastinem. Dermis je tvořena ze dvou vrstev, a to z tenčí stratum papillare, která obsahuje řídké kolagenní vazivo a silnější stratum reticulare, která obsahuje husté kolagenní vazivo (Lawton, 2019).

1.1.2 Keratinocyty

Keratinocyty jsou nejpočetnější stavební buňky epidermis. Keratinocyty na rozdíl od melanocytů a Langerhansových buněk jsou mnohem větší. Pokud dojde k narušení kůže krev sajícími ektoparazity (např. klíšťata), keratinocyty jsou právě jedny z prvních buněk, se kterými tyto parazité přicházejí do styku (Barbieri et al., 2014; Kotál et al., 2015).

Keratinocyty se tvoří ve vrstvě stratum basale a k jejich diferenciaci dochází při jejich pohybu vzhůru směrem k stratum spinosum a granulosum, kde se začne vytvářet struktura keratinu. Poté začínají vznikat mikrofilamenta a mikrotubuly, což jsou základní stavební jednotky cytoskeletu. Celý tento proces se nazývá keratinizace neboli rohovatění kůže. K poslední fázi diferenciaci keratinocytů dochází ve stratum corneum, kde z keratinocytů vznikají mrtvé, zploštělé buňky zvané korneocyty. Korneocyty jsou zrohovatělé buňky, které vytváří tvrdší vrstvu kůže. Postupně pak na povrchu dochází k tzv. deskvamaci, což znamená olupování vnějších vrstev kůže (Obr. 3). Celý tento proces diferenciaci trvá 28 dní (Lawton, 2019).



Obr. 3: Deskvamace kůže (Lawton, 2019).

Keratinocyty hrají významnou roli ve vrozené imunitě. Mají totiž schopnost produkovat celou řadu signálních proteinů, tzv. cytokinů a také v případě zánětu prezentovat antigeny pomocí MHC I a MHC II. Jelikož keratinocyty přicházejí do styku s patogenem jako jedny z prvních buněk, mají na svém povrchu specifické bílkovinné receptory, tzv. Toll-like receptory. Tyto receptory jsou schopné rozeznávat cizí, nebezpečné struktury známé jako PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), které se vyskytují na povrchu patogenních organismů. Aktivace Toll-like receptorů na keratinocytech je klíčová pro vyvolání kožní imunitní odpovědi, což vede k převážně buněčné odpovědi Th1 buňkami doprovázené aktivací interferonů typu I (Feliciani et al., 1996; Gröne, 2002; Miller, 2008; Matejuk, 2018; Quaresma, 2019).

Produkce cytokinů keratinocyty

Cytokiny zajišťují buněčnou komunikaci mezi sousedními buňkami (parakrinní účinek), mezi vzdálenými buňkami (endokrinní účinek) anebo působí na buňku, která je produkuje (autokrinní účinek). Cytokiny produkované epitelovými buňkami udržují v těchto místech normální homeostatické mechanismy a mohou indukovat proliferativní změny způsobené poraněním. Kožní a slizniční cytokiny mohou mít prozánětlivé i protizánětlivé funkce. Dysfunkce regulace cytokinů může přispívat k zánětlivým onemocněním a pokud dojde k nekontrolovatelné zánětlivé odpovědi, mohou se tyto cytokiny podílet na vzniku autoimunitních kožních onemocnění jako např. psoriáza (lupénka) nebo rosacea (růžovka) (Feliciani et al., 1996; Li et al., 2017).

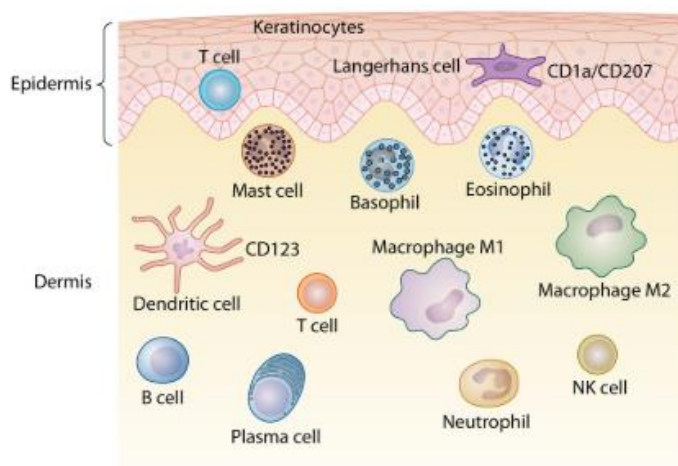
Keratinocyty produkují několik druhů interleukinů s mnoha rozdílnými funkcemi. Keratinocyty mohou produkovat např. IL-1, který se uplatňuje v buněčné imunitě a zahajuje zánětlivou odpověď. IL-1 je pro keratinocyty chemotaktický, vyvolává zvýšenou expresi

keratinu 6, snižuje přilnavost některých bakterií na keratinocyty a chrání keratinocyty před apoptózou vyvolanou navázáním TNF. Dále keratinocyty produkují IL-6 a IL-8, které podporují zánět a IL-6 navíc velmi podporuje proliferaci keratinocytů. Keratinocyty mají schopnost produkovat i IL-10, který zánět naopak inhibuje. Keratinocyty mohou také produkovat tumor necrosis faktor – např. TNF- α , který může způsobit smrt nádorových buněk. V neposlední řadě mohou produkovat i interferony – např. INF- β a INF- λ , které mají antivirový účinek a při virové infekci je jejich hladina zvýšena. INF- λ je pro keratinocyty a jiné epiteliální buňky (např. hepatocyty) velmi typický a hraje velmi důležitou roli v odpovědi na virovou infekci. Svým působením totiž chrání buňky proti mnoha druhům virům. Samotný INF- λ se dá využít i jako terapeutikum, např. proti viru hepatitidy C (Feliciani et al., 1996; Gröne, 2002; Hermant et al., 2014; López et al., 2018; Garcia et al., 2018).

Exprese výše zmíněných cytokinů je ovlivněna několika faktory. Např. rozpoznání dvouvláknové RNA, která může pocházet buď z virů nebo z poškozené buňky, Toll-like receptorem vede ke zvýšené expresi IFN- β , IL-8 a TNF- α . Dalším ovlivňujícím faktorem může být mechanické poškození kůže, které způsobí zvýšenou expresi IL-6 (Piipponen & Landén, 2020).

1.1.3 Imunitní odpověď kůže

Imunitní reakce v kůži jsou důležité pro obranu hostitele proti patogenním mikroorganismům. Kůže je orgán obsahující několik typů imunitních buněk, které se podílejí na vrozených a adaptivních imunitních reakcích. Schéma buněk imunitního systému v kůži je znázorněno na Obr. 4 (Quaresma, 2019).



Obr. 4: Schéma buněk imunitního systému v kůži (Quaresma, 2019).

Velmi důležitou funkci v imunitní odpovědi mají antimikrobiální peptidy (AMPs), které chrání organismus proti infekci. Aktivovat AMPs mohou dva interleukiny, a to IL-17 a IL-22. AMPs může vytvářet několik druhů buněk, jako např. keratinocyty, fibroblasty, dendritické buňky, monocyty anebo makrofágy (Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

Langerhansovy buňky (LCs)

Langerhansovy buňky (LCs) jsou jediným typem myeloidních buněk nacházejících se v epidermis. LCs obsahují charakteristická Birbeckova granula, která hrají důležitou roli při degradaci patogenů. LCs na svém povrchu exprimují molekulu langerin (CD207), která je součástí Birbeckových granul a dokáže rozpoznávat a vázat sacharidy, díky čemuž pak LCs lépe dokážou identifikovat patogeny. Další marker, který je typický pro kožní LCs, je CD1a. Vývoj kožních LCs je odlišný od ostatních LCs, které ve většině případů vznikají z prekurzorů v kostní dřeni. Kožní LCs jsou odvozeny z myeloidních progenitorových buněk z jater nebo ze žloutkového vaku. LCs se vyznačují vysokou expresí MHC II a vyskytují se v první linii při imunitní odpovědi. Jsou to důležité antigen prezentující buňky, kdy antigen prezentují jak CD8+ cytotoxickým T lymfocytům, tak CD4+ pomocným T lymfocytům. LCs z kůže migrují do spádových lymfatických uzlin, kde se vyvíjí imunitní odpověď a během zánětu se rychlost jejich migrace zvyšuje (Rajesh & Hibma, 2019; Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

Kožní dendritické buňky (dDC)

Dendritické buňky, které se vyskytují v dermis, jsou známé jako kožní dendritické buňky (dDC). Podobným způsobem jako LCs migrují dDC do lymfatických uzlin. Jsou to profesionální antigen prezentující buňky, které hrají důležitou roli při prvotní adaptivní imunitní odpovědi (Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

Makrofágy

Makrofágy mohou být dvojího původu. Buďto mohou vznikat z embryonálních progenitorových buněk, které se v kůži tvoří prenatálně a samy se obnovují, anebo častěji vznikají z monocytů, které dozrávají v makrofágy, jakmile se dostanou do kůže (Ginhoux & Jung, 2014). Makrofágy mají velmi důležitou roli fagocytózy patogenů a nekrotické tkáně. Mimo jiné produkují několik cytokinů (IL-1, TNF α , IL-6) a chemokinů, které indukují rozvoj supresivní nebo prozánětlivé odpovědi a podílí se na procesu hojení ran. Makrofágy lze rozdělit podle jejich funkce do dvou skupin – prozánětlivé M1 a protizánětlivé M2 (Nahrendorf & Swirski, 2016; Nguyen & Soulika, 2019).

Žírné buňky

Žírné buňky se nevyskytují v první linii, ale jsou přítomny až ve spodní vrstvě dermis. Žírné buňky vstupují do kůže z kostní dřene jako progenitorové buňky a dozrávají až v místě reakce na podněty prostředí. Zrání žírných buněk mohou ovlivňovat některé cytokiny, např. IL-3, IL-4, IL-9 a IL-10. U lidí se žírné buňky nacházejí ve všech oblastech kůže, ale nejvíce jich je v pažích a nohách. Hustota žírných buněk v papilární dermis se zvyšuje s věkem a jsou nejčastěji lokalizovány v blízkosti nervových vláken. Žírné buňky obsahují granula, ve kterých jsou preformované mediátory (např. histamin, serotonin nebo tryptáza). Dále mohou žírné buňky produkovat zánětlivé cytokiny a hrají důležitou roli v alergiích, jelikož produkují histamin a na svém povrchu mají receptory pro IgE (Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

Eosinofily

Eosinofily se také vyskytují v dermis a poskytují obranu proti parazitům, jelikož obsahují pro parazity toxická granula, jejichž obsah jsou schopny vypustit do prostředí (Jacobsen et al., 2012; Long et al., 2016). Aktivaci eosinofilů způsobí zvýšená exprese cytokinů produkovaných Th2 lymfocyty (Cook et al., 2011).

Neutrofily

Neutrofily se nacházejí v dermis a patří mezi první imunitní buňky, které migrují do poraněné tkáně (např. mechanickým poraněním), kde zůstávají po dobu 2-5 dnů a pak dochází k jejich apoptóze. Když se tyto buňky dostávají do místa infekce, exprimují receptory, které rozpoznávají mikroorganismy, a díky nim jsou neutrofily schopné se na ně vázat a následně je fagocytovat. Ve fagolysosomech jsou přítomny mikrobicidní molekuly (např. reaktivní formy kyslíku (ROS), oxid dusnatý nebo proteolytické enzymy) a pohlcené mikroorganismy jsou tak zničeny (Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

T lymfocyty

Kůže obsahuje různé typy lymfoidních buněk, z nichž všechny jsou důležité jak v klidovém stavu, tak při zánětlivých reakcích. T lymfocyty jsou důležitou složkou adaptivní imunity a hrají stěžejní roli v obraně proti patogenům a nádorům. Jejich dysregulace přispívá k rozvoji různých onemocnění. T lymfocyty dozrávají v brzlíku, kde procházejí přeskupením somatických genů vedoucím k expresi jedinečného T buněčného receptoru (TCR). Během pozitivní selekce dochází k eliminaci těch T lymfocytů, které nedokážou rozeznat

antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC I a MHC II). T lymfocyty, které dokážou rozpoznat MHC I, mají na svém povrchu CD8 proteiny a T lymfocyty, které dokážou rozeznat MHC II, mají na svém povrchu CD4 proteiny. CD4 a CD8 slouží jako ko-receptor TCR a napomáhají v komunikaci s antigen prezentujícími buňkami, čímž podporují efektivní odpověď na antigen. K aktivaci T lymfocytů dochází navázáním antigenu na TCR, následuje množení a diferenciací T lymfocytů, ze kterých se stávají buňky efektorové. Ty přispívají k odstranění patogenů a po jejich vymizení 95 % efektorových buněk podléhá apoptóze. Ze zbývajících T lymfocytů vznikají paměťové buňky (Sabat et al., 2019).

Existuje speciální druh T lymfocytů tzv. $\gamma\delta$ T-lymfocyty, které mají odlišné složení TCR. Tyto lymfocyty mají receptory složené z γ a δ heterodimerů, které jsou homologní s α a β řetězci TCR nalezených na CD4+ a CD8+ T lymfocytech. $\gamma\delta$ T-lymfocyty nedokážou rozeznat antigeny prezentované pomocí MHC II, ale dokážou rozeznat alkylaminy, malé fosforylované molekuly, lipidy (ty, které se v makroorganismech běžně nenachází) a proteinové a neproteinové antigeny, které nejsou prezentovány antigen prezentujícími buňkami. Pro $\gamma\delta$ T-lymfocyty není prezentace antigenu pomocí MHC molekul tudíž potřebná, čímž se liší od $\alpha\beta$ T-lymfocytů, které prezentaci antigenu pomocí MHC molekul potřebují. O funkci $\gamma\delta$ T-lymfocytů v lidské kůži toho zatím není mnoho známo, nicméně byla pozorována zvýšená exprese $\gamma\delta$ T-lymfocytů během několika druhů onemocnění kůže (melanom, leishmanióza, lepra) (Cruz et al., 2018; Quaresma, 2019).

V myši kůži $\gamma\delta$ T-lymfocyty vytváří tzv. DETC (dendritické epidermální T-lymfocyty). V jiné části těla myši toto uskupení nebylo nalezeno. DETC „monitorují“ buňky epidermis a jsou připraveny rozpoznat antigeny exprimované sousedními keratinocyty a reagovat na ně. Pokud se keratinocyty nachází ve stavu buněčného stresu, DETC začnou sekretovat chemokiny, růstové faktory a cytokiny, které podporují zánět kůže, zabíjí nádorové buňky a účastní se hojení ran. Tyto funkce byly popsány na myši epidermis, nicméně je potvrzeno, že populace $\gamma\delta$ T-lymfocytů je přítomna i v lidské epidermis společně s převládajícími $\alpha\beta$ T-lymfocyty (Cruz et al., 2018; MacLeod & Havran, 2011).

B lymfocyty

B buňky se v průběhu kožních onemocnění nacházejí v dermis a jsou spojeny se zvýšenými hladinami IgM, IgE a IgG. B lymfocyty obvykle hrají ústřední roli v humorální imunitní odpovědi, protože syntetizují protilátky. Kromě tvorby protilátek mohou B lymfocyty fungovat jako antigen prezentující buňky a produkovat cytokiny, které ovlivňují tkáňovou a systémovou imunitu. B lymfocyty migrují do kůže přes endotel, kde interagují

s receptory selektinů (membránové glykoproteiny) a integrinů (membránové proteiny, které umožňují přilnutí buněk k podkladu). B lymfocyty migrují směrem k antigenu, kde antigen prezentující buňky aktivují naivní lymfocyty přítomné v tkáni. Mechanismy, kterými B buňky přispívají k zánětlivé kožní patologii, zahrnují interakci se složkami vrozené imunity a s T lymfocyty. B lymfocyty u kožních infekcí hrají důležitou roli nejenom v syntéze specifických protilátek, ale i v opsonizaci bakterií a v indukci fagocytózy makrofágy a neutrofilů (Quaresma, 2019; Nguyen & Soulika, 2019).

1.2 VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY (TBEV)

Klíšťová encefalitida (TBE) je způsobena virem klíšťové encefalitidy (TBEV), jedním z nejrozšířenějších arbovirů v Evropě a v mnoha částech Asie a je považována za jednu z nejnebezpečnějších lidských infekcí. Udává se, že TBEV způsobuje nejméně 11 000 lidských případů encefalitidy v Rusku a asi 3000 případů ve zbytku Evropy ročně. K přenosu TBEV na člověka obvykle dochází kousnutím infikovaného klíštěte (Gritsun et al., 2003; Dörrbecker et al., 2010).

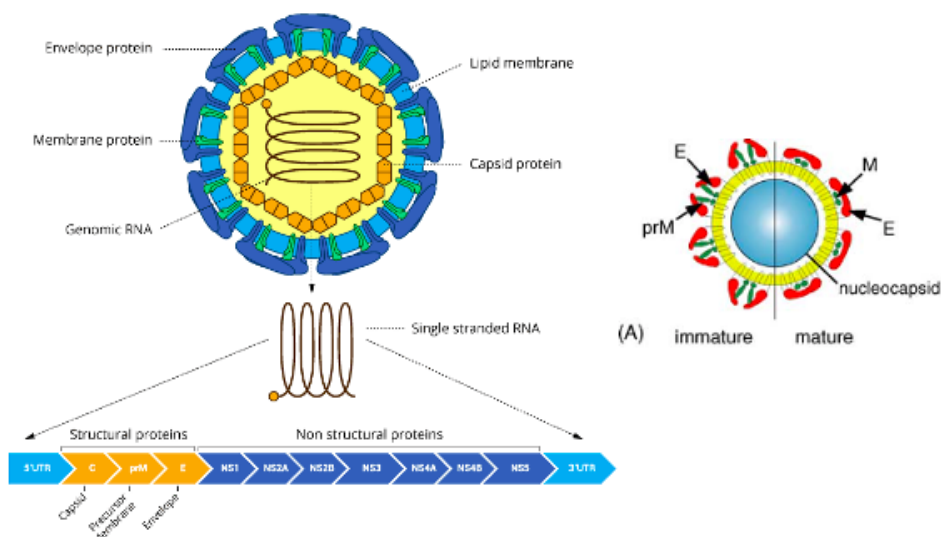
1.2.1 Taxonomie

TBEV se taxonomicky řadí do rodu *Flavivirus*, do čeledi Flaviviridae, kam patří i další lidské patogeny jako např. virus Zika, virus Dengue, virus západonilské horečky nebo virus japonské encefalitidy (Pulkkinen et al., 2018). Na základě sérologické a sekvenční analýzy byl TBEV rozdělen do tří podtypů: evropský, sibiřský a dálnévýchodní. Evropský podtyp je přenášán klíšťaty druhu *Ixodes ricinus*, kdežto sibiřský podtyp a dálnévýchodní podtyp jsou přenášeny klíšťaty druhu *Ixodes persulcatus* (Ecker et al., 1999).

1.2.2 Struktura TBEV

Viriony mají průměrně asi 50 nm a jsou složeny z nukleokapsidy obklopené lipidovou dvojvrstvou obsahující dva obalové proteiny: E (obalový glykoprotein) a M (membránový protein). Hlavním povrchovým proteinem virové částice je E protein, který interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává fúzi s membránou infikovaných buněk. Intracelulární viriony obsahují prekurzorový prM protein, ke štěpení prM na M furinem dochází při uvolnění virionů z buněk. Nukleokapsida se skládá z jednovláknové RNA pozitivní polarity o velikosti 11-12 kb a kapsidového proteinu (C). Genom kóduje jeden

otevřený čtecí rámec (ORF), který je obklopen 5' a 3' nekódujícími oblastmi. Ten je následně překládán do jednoho polyproteinu skládajícího se z 3 400 aminokyselin. Polyprotein je našťipán buněčnými a virovými proteázami na tři strukturální proteiny (C, M a E) a sedm nestructurálních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) (Lindquist & Vapalahti, 2008; Mandary et al., 2019). Struktura virionu a genomu flavivirů je na Obr. 5.

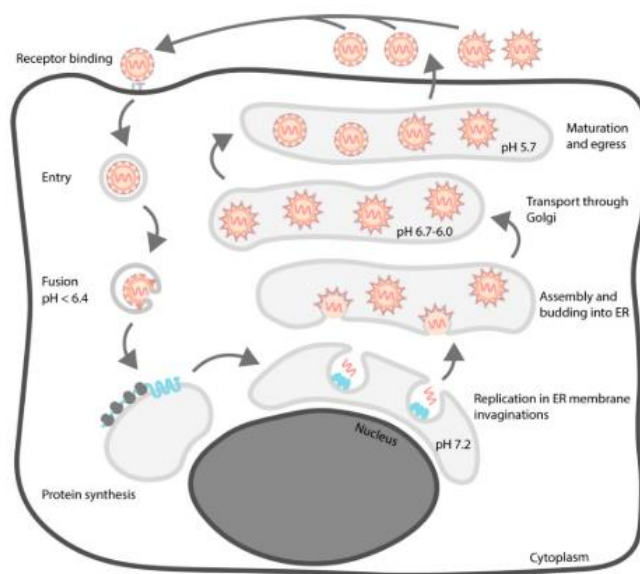


Obr. 5: Struktura virionu¹ a genomu flavivirů (Mandl, 2005).

1.2.3 Replikace TBEV

V prvním kroku se viriony vážou na povrch hostitelské buňky svým obalovým glykoproteinem E. Hostitelské buňky mají na svém povrchu glykosaminoglykany (např. heparansulfát). Virion interaguje s receptorem na povrchu hostitelské buňky a za pomoci proteinu klatrinu endocytózou vstupuje do buňky. Nízké pH endosomu indukuje reorganizaci proteinu E virového obalu z dimerů na trimery a začne fúze virové membrány s membránou endosomu. Tento proces vede k uvolnění virového nukleokapsidu do hostitelské cytoplazmy, tzv. odpláštění viru. Virový genom v tomto momentě není obalený a dochází k jeho replikaci. Virové proteiny jsou syntetizovány ribozomy hrubého endoplazmatického retikula (ER). Nově syntetizované RNA jsou zachyceny proteinem C na cytoplazmatické straně ER. Komplex nukleokapsidu získává strukturální proteiny E a M a lipidový obal tím, že přes membránu pučí do lumen ER. V tento moment vznikají nezralé částice, které obsahují proteiny prM a E na povrchu a nejsou infekční. Ty jsou následně transportovány sítí Golgiho aparátu a dozrávají v kyselém prostředí. Ke zrání virionu dochází štěpením proteinu prM proteázou furin hostitelskou buňkou. Tato konečná štěpná fáze produkuje malý protein M a

iniciuje reorganizaci proteinu E za vzniku homodimerů, které jsou kompetentní k následné fúzi. Zralé částice obsahující protein M vystupují z infikované buňky spolu s částečně vyzrálými a nezralými částicemi. Zralé a částečně zralé částice mohou zahájit nový cyklus infekce, nicméně nezralé částice nejsou schopny fúze, a tím pádem nedokážou zahájit nový cyklus, jsou tedy neinfekční (Mandl, 2005; Pulkkinen et al., 2018). Schéma replikace TBEV je na Obr. 6.



Obr. 6: Schéma replikace viru (Pulkkinen et al., 2018).

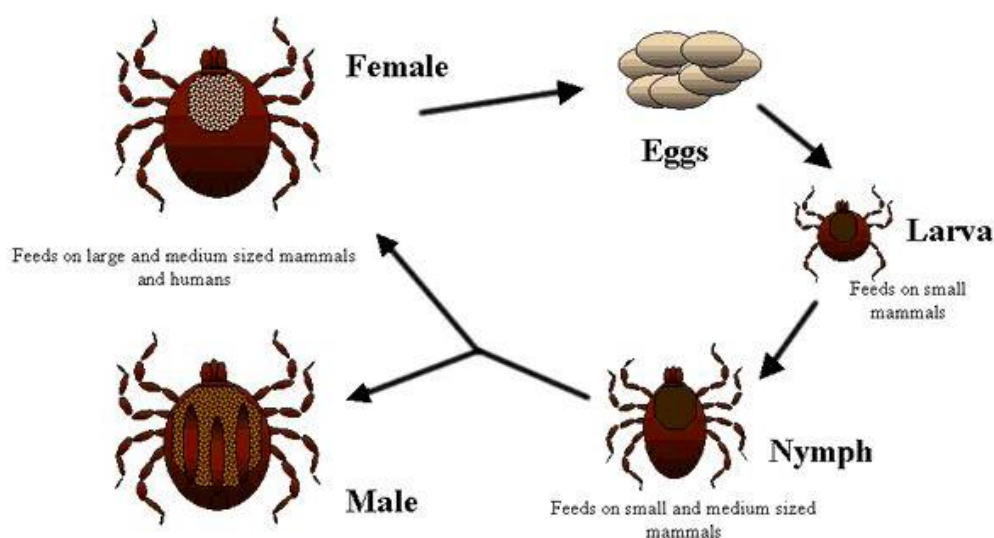
1.2.4 Přenos TBEV

TBEV se na člověka přenáší ve většině případů klíštětem. Po kousnutí infikovaným klíštětem přijdou do kontaktu s virem jako první dendritické buňky a Langerhansovy buňky, které pravděpodobně zprostředkují transport viru do spádových lymfatických uzlin a virus se replikuje v lymfatických uzlinách, což vede k virémii. Následně se šíří do dalších orgánů včetně CNS. Mimo přenosu TBEV klíštětem jsou známy další příležitostné způsoby přenosu na člověka např. konzumací infikovaného nepasterizovaného mléka (Wikel et al., 1994; Růžek et al., 2010).

Klíště

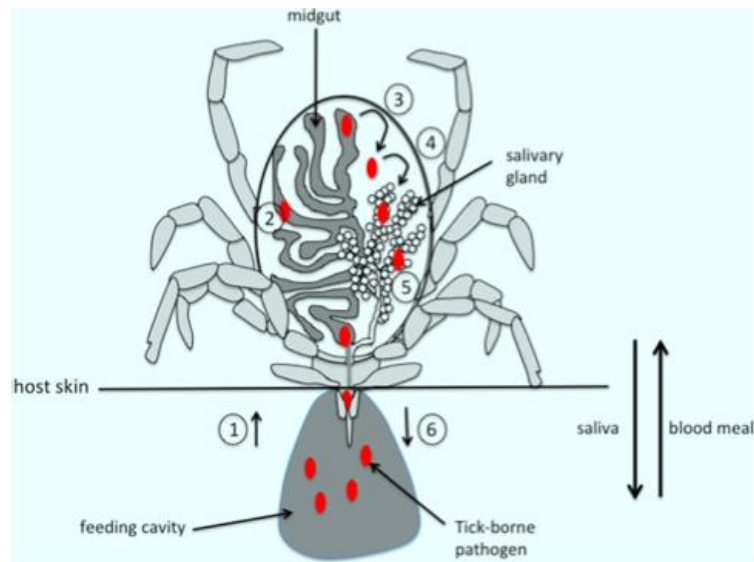
Klíšťata jsou krev sající členovci příbuzní pavoukům a štírům. Je známo téměř 900 druhů klíšťat, z nichž 702 druhů jsou klíšťata rodu *Ixodes* (čeleď Ixodidae – tvrdá klíšťata), zatímco 193 druhů jsou klíšťata rodu *Argas* (čeleď Argasidae – měkká klíšťata) a jeden druh se vyskytuje v čeledi Nuttalliellidae (Guglielmone et al., 2010). Životní cyklus klíšťat rodu *Ixodes* se skládá ze tří vývojových stadií – larva, nymfa a dospělec (Obr. 7). Klíšťata sají krev

na vhodném jedinci ze dvou důvodů – potřebují dostatek potravy, aby se mohla vyvíjet z jednoho stadia do druhého a dospělé samice navíc potřebují dostatek potravy k produkci vajíček. Každá fáze životního cyklu trvá přibližně jeden rok (nejkratší životní cyklus klíštěte trvá v průměru tři roky) a poté je klíště připraveno vyvinout se do dalšího stádia (Růžek et al., 2010). TBEV se dostane do těla klíštěte při sání krve z některého hostitele (nejčastěji hlodavci) a nejprve infikuje buňky střevní stěny. Po infekci buněk střeva přechází TBEV do slinných žláz a k přenosu dochází během následného sání na jiném hostiteli (Nuttall et al., 1994).



Obr. 7: Životní cyklus *Ixodes ricinus* ².

Klíšťata jsou obligátní krev sající ektoparaziti a mohou sát na několika druzích obratlovců (obojživelníci, plazi, ptáci, savci). Klíšťata potřebují svým speciálním sacím ústrojím (hypostom s háčky) narušit epidermis a proniknout tak přes kůži hostitele. Následně ukotví své sací ústrojí v kůži pomocí tzv. cementu (Kazimírová & Štibrániová, 2013). V důsledku poranění a protržení cév, ke kterému dochází během porušení epidermis, se v dermis vytvoří krvavá ranka, která slouží k přerušovanému sání krve klíštětem a k sekreci slin (Bartíková et al., 2020). Schématické znázornění získání, vývoje a přenosu TBEV klíštětem je znázorněno na Obr.8.

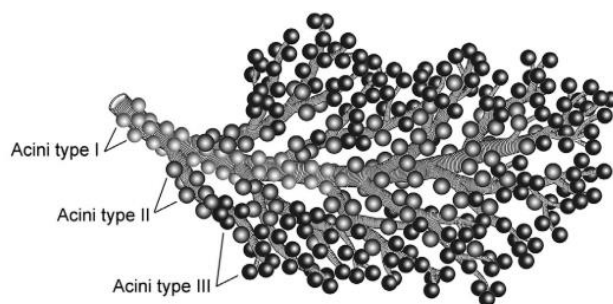


Obr. 8: Schéma přenosu TBEV klíštětem (Šimo et al., 2017).

- 1) TBEV se dostává do těla klíštěte společně s krví během sání na hostiteli.
- 2) TBEV začíná napadat střevo.
- 3) TBEV pronikne epitelem trávicího traktu a napadne tělo klíšťat.
- 4) Patogeny se přesouvají do slinných žláz.
- 5) Patogeny napadají slinné žlázy.
- 6) Patogeny se během krmení dostávají do nového hostitele spolu se slinami, které působí proti hostitelské hemostáze, zánětu a imunitním reakcím a usnadňují tím infekci hostitele. Pro přehlednost schématu je na obrázku znázorněna pouze polovina trávicího traktu a jedna slinná žláza.

Klíštěcí sliny

V případě, že je klíště infikováno, infekční agens se přenáší prostřednictvím jejich slin (Nuttall, 2019). Klíštěcí sliny jsou vylučovány slinnými žlázami, které také zprostředkují několik dalších biologických funkcí (např. sekreci cementu) (Šimo et al., 2017). Párové slinné žlázy tvoří „hroznovitě“ seskupení lalůček (acini) umístěné na obou stranách tělní dutiny klíštěte a představují největší žlázy v jejich těle. Existují dva hlavní typy lalůček slinných žláz – agranulární a granulární. Zatímco u všech druhů klíšťat je přítomen pouze jeden typ agranulárního lalůčku (typ I), u klíšťat z čeledi Argasidae je přítomen pouze jeden typ granulárních lalůček (typ II) a u klíšťat z čeledi Ixodidae se vyskytuje několik typů zároveň (typ II, III a IV, který je specifický pouze pro samečky) (Obr.9). Agranulární lalůčky (typ I) spojují přední část hlavního slinného kanálu a příležitostně i proximální oblasti vedlejších kanálů, kdežto granulární lalůčky (typu II a III) jsou umístěné dál, a to v sekundárních a terciárních kanálcích (Bonnet et al., 2018).



Obr. 9: Seskupení lalůčku ve slinných žlázách klíšťat z čeledi Ixodidae (Bonnet et al., 2018).

Multifunkční slinné žlázy klíšťat hrají důležitou fyziologickou roli nezbytnou pro přežití klíšťat během fáze na hostiteli i mimo něj (Bonnet et al., 2018). Klíštěcí sliny jsou důležitým biologickým materiálem, který tlumí obranyschopnost hostitele a usnadňuje sání, aniž by si toho hostitel všiml. Sliny mají proto mnoho speciálních funkcí, např. cytolytickou, vasodilatační, antikoagulační, protizánětlivou a imunopresivní (Šimo et al., 2017).

Celá imunitní reakce začíná v okamžiku, kdy hypostom klíštěte proniká kůží hostitele a naruší ji. První buňky, které přijdou do kontaktu s klíštěcími slinami jsou keratinocyty. Dalšími buňkami, které se slinami reagují, jsou Langerhansovy buňky, žírné buňky, eozinofily, dendritické buňky a makrofágy (Francischetti et al., 2009). Klíštěcí antigen je z velké části transportován Langerhansovými buňkami do spádových lymfatických uzlin a zde je prezentován T lymfocytům. V tento moment T lymfocyty začnou produkovat cytokiny a spouští se protilátková odpověď (Wikel et al., 1994; Wikel, 1996). Důležitou roli v imunitní odpovědi hostitele na klíště hraje histamin, který způsobuje roztažení cév a je mediátorem zánětu. V místě, kde se klíště přichytilo na kůži, dojde díky histaminu k zarudnutí a otoku, což klíštěti komplikuje jeho sací proces. Histamin také potlačuje produkci slin klíštětem (Nuttall & Labuda, 2004).

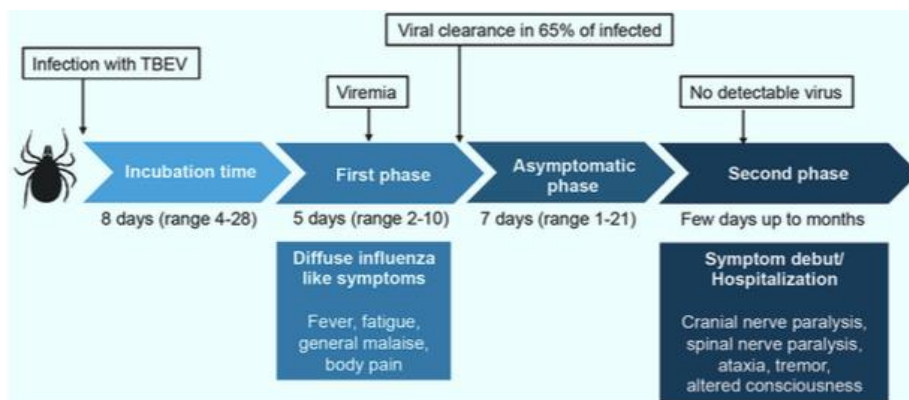
Aby klíšťata mohla nerušeně sát krev na hostiteli, umí mnoho imunitních reakcí potlačit, např. v jejich slinách jsou obsaženy speciální proteiny, které dokážou přímo vázat histamin a ten se pak nemůže účastnit imunitní reakce hostitele. Klíšťata dále dovedou potlačit i hemostatické reakce hostitele. Hemostáza, která zahrnuje koagulaci, vazokonstrikci a agregaci krevních destiček, je prvním vrozeným mechanismem obrany hostitele proti mechanickému poranění způsobenému vniknutím klíštěte do kůže. Tato reakce hostitele dále zahrnuje aktivaci komplementu a vznik zánětu (Francischetti et al., 2009).

Buňky, které jsou ovlivněny klíštěcími slinami, mohou mít zcela odlišnou odpověď, než pokud klíštěcími slinami ovlivněny nejsou. Např. bylo zjištěno, že při infekci bakterií

Borrelia klíštěcí sliny vyvolaly silnou cytokinovou odpověď lidských primárních keratinocytů, která byla mnohem větší než odpověď vyvolaná pouze samotnou bakterií bez klíštěcích slin (Bernard et al., 2016). Jaký vliv mají klíštěcí sliny na keratinocyty při infekci TBEV nebylo dosud publikováno, nicméně bylo prokázáno, že sliny komára *Aedes aegypti*, který přenáší virus Dengue (čeleď Flaviviridae), zvyšují virovou infekci lidských keratinocytů potlačením vrozené imunitní odpovědi (Surasombatpattana et al., 2012). V další studii bylo prokázáno, že sliny komárů rodu *Aedes* a rodu *Culex*, kteří přenáší virus západonilské horečky (WNV), mají na antivirovou odpověď keratinocytů inhibiční účinek (Garcia et al., 2018). Klíštěcí sliny působí i na ostatní buňky imunitního systému. V mnoha případech indukují nebo potlačují tvorbu různých cytokinů. Klíštěcí sliny u makrofágů indukují produkci IL-4 a IL-10 a naopak inhibují tvorbu TNF a INF- γ , u dendritických buněk inhibují produkci IL-6, TNF a IFN- β a u lymfocytů indukují tvorbu IL-4, IL-6 a IL-10, kdežto tvorbu IL-2, IL-12 a TNF inhibují (Kotál et al., 2015).

1.2.5 Příznaky TBE

TBE má ve většině případů asymptomatický průběh. U průběhu symptomatického je inkubační doba většinou 7-14 dní (Dumpis et al., 1999). Počáteční viremická fáze se obvykle projevuje nespecifickými příznaky podobnými chřipce – horečka, únava, malátnost, bolest hlavy a těla (Lindquist & Vapalahti, 2008). Po této fázi následuje zlepšení nebo dokonce asymptomatický interval. Pak se rozvine druhá febrilní fáze, která vypadá u 50 % dospělých pacientů jako meningitida, u 40 % dospělých pacientů jako meningoencefalitida a u 10 % dospělých pacientů se může objevit meningoencefalomyelitida (Bogovic et al., 2010). V druhé fázi onemocnění není v séru ani plazmě detekován žádný virus. Přibližně 30 % pacientů, kteří prodělali druhou fázi onemocnění, má dlouhotrvající následky a kvůli tomu sníženou kvalitu života (Blom et al., 2018).



Obr. 10: Schéma průběhu TBE (Blom et al., 2018).

1.3 INTERAKCE VIRŮ S KERATINOCYTY

Keratinocyty jsou hlavními buňkami epidermis a může v nich docházet k replikaci viru. S keratinocyty přichází do kontaktu zejména arboviry, které jsou přenášeny na obratlovce kousnutím infikovanými členovci. Mezi arboviry patří mimo jiné i čeleď Flaviviridae (Labuda et al., 1996; Pulkkinen et al., 2018; Chessa et al., 2020).

1.3.1 Interakce flavivirů s keratinocyty

Virus západonilské horečky (WNV), který způsobuje velmi vážné onemocnění, je přenášen komárem rodu *Culex* do epidermis společně s jeho slinami. WNV se začne v kůži replikovat a následně migruje do spádové lymfatické uzliny, což vede k rozsáhlé virémii a v některých případech k neurologickým symptomům. Bylo experimentálně prokázáno, že keratinocyty jsou hlavním cílem WNV. Titry viru produkovaného primární kulturou lidských keratinocytů dosahovaly hodnot 10^7 PFU/ml již za 30 hodin po infekci (Lim et al., 2011). Tento fakt byl potvrzen i v jiné studii, kde kromě množení viru v keratinocytech, byla studována navíc i imunitní odpověď keratinocytů na infekci WNV. V tomto experimentu byla virová nálož testována pomocí RT-PCR a předpokládané zvýšení množství viru WNV se potvrdilo u všech testovaných MOI (0.1, 1 a 10) během 24 hod. Po 72 hod množství WNV vzrostlo dvojnásobně pouze při MOI = 0.1 a 1 a při MOI = 10 byla pozorována masivní lýza keratinocytů. U infikovaných keratinocytů byla navíc prokázána indukce interferonu typu I a III (IFN- β , IFN- λ 1 a λ 2). Dále bylo potvrzené i významné zvýšení prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-6) a různých chemokinů (CXCL1, CXCL2, CXCL8 a CCL20) (Garcia et al., 2018).

Dalším experimentem bylo prokázáno, že keratinocyty jsou cílem i pro virus Powassan, který způsobuje velmi vážnou encefalitidu a je přenášen klíštětem *Ixodes scapularis*. Virus byl v keratinocytech detekován metodou RNA hybridizace *in situ* (Hermance & Thangamani, 2020).

V keratinocytech se množí i virus Dengue (DENV), který je přenášen komáry rodu *Aedes*. DENV jako první infikuje fibroblasty společně s keratinocyty. V tomto experimentu byla infikovaná lidská linie keratinocytů (HaCaT) a detekce viru byla prováděna pomocí imunofluorescence v různých časových intervalech. Procento infikovaných buněk bylo kvantifikováno průtokovou cytometrií a zjistilo se, že 24 hodin po infekci exprimovalo virový protein E 10 % buněk a tento počet se zvýšil 48 hodin po infekci na přibližně 23 %. Tento výsledek jasně ukazuje na replikaci DENV v keratinocytech. Pro potvrzení tohoto zjištění byla ještě provedena plaková titrace při MOI 10 ve třech časových intervalech (24 hod, 48 hod a 72 hod po infekci) a bylo detekováno zvýšení titru viru v závislosti na čase. Následně

byla ještě prokázána i produkce interferonů typu I a typu III (IFN- β a IFN- λ) a zvýšení sekrece interleukinů IL-6 a IL-8 (López et al., 2018).

U viru Langat byla také studována interakce s keratinocyty. Bylo prokázáno, že virus prostřednictvím buněčných exosomů dokáže infikovat kožní keratinocyty a endoteliální krevní buňky (Zhou et al., 2018).

Jediná experimentální práce ukázala, že se v keratinocytech množí i TBEV. Byly připraveny primární kultury buněk z kůže myšího ucha. Ty byly následně inkubovány za přítomnosti viru po dobu 48 hodin. Ukázalo se, že titry TBEV po 48 hod byly 10^7 PFU/ml a po dalších 48 hod se titry viru udržovaly téměř ve stejných hodnotách (Labuda et al., 1996).

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Příprava primokultury myších keratinocytů a jejich kultivace.
- 2) Infekce těchto buněk TBEV, detekce viru metodou IFAT (Indirect Immunofluorescence Antibody Test).
- 3) Množení viru v keratinocytech (plaková titrace).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Myši

Pro získání primární kultury keratinocytů byla použita čerstvě narozená (do 3 dnů po narození) mláďata samic inbredního myšního kmene C57BL/6N (Velaz s.r.o.). Myši byly chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.2 Primární kultura

V pokusech byla používána primární kultura myších keratinocytů, která byla první den kultivována při 37 °C v „Plating“ médiu (calcium-free MEM- α (Gibco), 1 % ATB, 1 % L-glutamin, 2 % dialyzovaného BOFES (bovinní fetální sérum; Gibco), 1 % insulin-transferin selenium (Bio-Techne), 25 μ M CaCl₂, 5 μ g/ml EGF).

Následující den jim bylo toto médium vyměněno za růstové médium pro keratinocyty (calcium-free MEM- α (Gibco), 1 % ATB, 1 % L-glutamin, 1 % BSA (bovine serum albumin), 1 % insulin-transferin selenium (Bio-Techne), 25 μ M CaCl₂, 0,5 μ g/ml EGF a 0,2 % BPE (bovine pituitary extract; Gibco)). Primární kultura byla kultivována při 5 % CO₂.

3.1.3 Buněčná linie

Na stanovení titru viru byla použita buněčná linie buněk PS (buněčná linie byla derivována z buněk prasečí ledviny) kultivované při teplotě 37 °C v médiu L15 (Leibowitz) 3 % PTS (prekolostrálního telecí sérum, 1 % ATB a 1 % L-glutamin).

3.1.4 Virus klíšťové encefalitidy

K infekci keratinocytů byl použit kmen Hypr pomnožený na buňkách VERO. Titr tohoto kmene je 7,7x10⁷ PFU/ml.

3.1.5 Klíštěcí sliny

Sliny byly získány z dospělých samic klíšťat *Ixodes ricinus*, které sály na morčatech po dobu 6-7 dnů. Každá samice byla připevněna na podložní sklíčko za pomoci oboustranné

lepicí pásky a na hypostom a jednu palpu jim byla nasazena kapilára, která zachytávala jejich sliny. Tato kapilára byla ještě navíc fixována pomocí plastelíny. Poté byl na hřbet samic nakápnut 1 μ l 5 % roztoku pilokarpinu (Sigma) v 95 % etanolu (Penta), aby se indukovalo slintání. Samice klíšťat byly následně umístěné do vlhké komůrky, kde byly ponechány 2 hodiny v termostatu při 37 °C a 5% CO₂. Po této době byly sesbírány sliny, spojeny, sterilizovány filtrací přes filtr 0,22 μ m a uchovány při teplotě -70 °C. Ve slinách byl poté určen obsah proteinu pomocí metody pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bradford 1976). Pro tuto práci byly použity sliny v koncentraci proteinu 500 μ g/ml, 400 μ g/ml a 340 μ g/ml. Sliny byly vždy naředěny Growth médiem na koncentraci 10 μ g/ml.

3.2 METODY

3.2.1 Příprava primární kultury keratinocytů

Po odejmutí mládřat od matky, byla mládřata zchlazena a zabita dekapitací a byl jim odstraněn ocas a nohy. Následně jim byla nastříhnutá hřbetní část kůže, která byla ihned poté stažena. V dalším kroku byla kůže umístěna do Petriho misky s 0,25% trypsinem (Sigma) v HBSS epidermis nahoru a zůstala takto namočená přes noc při 4 °C.

Vlastní trypsinizace proběhla při 37 °C a 5% CO₂ 15 minut. Poté byla kůže vložena do „Air“ média (RPMI-1640, 10 % BOFES, 1 % ATB) a následovalo oddělení epidermis od dermis. Ze spodní strany epidermis byly seškrabány keratinocyty. Buňky byly 2x promyty v „Air“ médiu (5 min při 1000 rpm, 4 °C) a 2x v „Plating“ médiu, ve kterém se již ponechaly. Keratinocyty byly spočteny v Bürkerově komůrce, část jich byla nasazena na panel o 96 jamkách nebo na sklíčka o 6 jamkách a část jich byla zmrazena.

Keratinocyty se nasazovaly v různém množství. Na sklíčka o 6 jamkách bylo vždy nasazeno 500 μ l/jamku buněčné suspenze v množství 2×10^5 buněk/ml a na panel o 96 jamkách bylo nasazeno 200 μ l/jamku buněčné suspenze v množství 3×10^5 buněk/ml.

Keratinocyty, které byly nasazeny na panel nebo sklíčka, byly první noc kultivovány v „Plating“ médiu při 37 °C a 5% CO₂ a další den jim bylo toto médium vyměněno za růstové médium pro keratinocyty. Keratinocyty byly dále kultivovány v termostatu při 37 °C a 5% CO₂ a výměna růstového média probíhala každý druhý den.

Keratinocyty na zmrazení byly v „Plating“ médiu rozsuspendovány do kryozkumavek po 900 μ l a k nim bylo přidáno 100 μ l dimethylsulfoxidu jako kryoprotektiva. Následně byly buňky zmrazeny a uchovány v tekutém dusíku.

3.2.2 Infekce keratinocytů

Keratinocyty byly vždy na každém sklíčku či panelu rozděleny do dvou skupin: se slinami a bez slin. Ze všech jamek bylo odsáto médium a ke skupině se slinami bylo přidáno 100 μ l/jamku klíštěcích slin v koncentraci proteinu 10 μ g/ml. Ke skupině bez slin bylo místo slin přidáno příslušné množství růstového média. Preinkubace trvala 1 hod v termostatu při 37 °C a 5% CO₂.

Po uplynutí 1 hod byl ke keratinocytům přidán virus kmene Hypr v množství MOI=100 a MOI=1 (hodnota MOI udává, kolik virových částic připadá na jednu buňku). Virus byl přidán v množství 100 μ l /jamku a poté následovala adsorpce 1 hod v termostatu při 37 °C a 5% CO₂.

Po hodinové adsorpci byl virus odsát a keratinocyty byly 2x promyty růstovým médiem v množství 200 μ l/jamku, aby se odmyly nenavázané virové částice. Ke skupině se slinami, bylo přidáno 200 μ l /jamku slin v koncentraci proteinu 10 μ g/ml a ke skupině bez slin bylo přidáno příslušné množství růstového média. Sklíčka nebo jamky s keratinocyty byly ve většině pokusů inkubovány: 1 den, 3 dny a 7 dnů po infekci (dpi) při 37 °C a 5% CO₂.

V každém časovém intervalu byly odebrány vzorky, které byly následně zmrazeny a uchovány -70 °C pro pozdější stanovení titru viru.

3.2.3 Plaková titrace

Pro stanovení titru viru byla použita metoda plakové titrace, která byla prováděna na PS buňkách.

PS buňky byly pomocí verzeny a trypsinu uvolněny ze dna kultivační lahve, následně byly spočteny v Bürkerově komůrce a naředěny do kultivačního média tak, aby měly výslednou koncentraci 3 \times 10⁵ buněk/ml. Takto připravena buněčná suspenze byla uložena do lednice, aby se zamezilo adhezi buněk.

Plaková titrace byla prováděna na 24 jamkových panelech. Nejprve bylo do všech jamek napipetováno 180 μ l média L15, 3 % PTS, 1 % ATB a 1 % L-glutamin a poté byl titrovaný vzorek desítkově ředěn přímo v jamkách panelu. V následujícím kroku bylo přidáno 300 μ l/jamku buněčné suspenze PS buněk. Obsah jamek byl promíchán a panely byly inkubovány 4 hod v termostatu při 37 °C a 0,5% CO₂.

Po uplynulých 4 hod bylo do každé jamky napipetováno 400 μ l přelivu, který byl před tím připraven smícháním 2x koncentrovaného kompletního L15 média a 3% roztoku

karboxymethylcelulózy (Sigma) v poměru 1:1. Panely byly inkubovány 5 dnů v termostatu při 37 °C a 0,5% CO₂

Po 5 dnech bylo provedeno barvení panelů, aby došlo k zviditelnění vzniklých plaků. Panely byly nejprve promyty ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl) a poté byly na 1 hodinu ponořeny do roztoku naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,5 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilovanou vodou). Po uplynutí 1 hod byly panely promyty pod tekoucí vodou a po usušení byly spočítány plaky.

3.2.4 Imunofluorescence

Nejdříve byly jamky ve všech časových intervalech 2x promyty PBS, poté bylo do jamek přidáno 50 µl/jamku fixačního roztoku (4% paraformaldehyd; ROTH) a sklíčka byla 15 min inkubována při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byly jamky 3x promyty PBS (50 µl/jamku), do všech jamek bylo přidáno 50 µl/jamku 0,1% Tritonu X-100 (SERVA) na permeabilizaci buněk. Vše se nechalo inkubovat opět 15 min.

Pak byly jamky promyty 2x PBS a bylo přidáno 50 µl/jamku 50mM NH₄Cl z důvodu blokace autofluorescence formaldehydu. Sklíčka byla inkubována 10 min. Tento krok byl proveden 2x.

Po promytí PBS (2x) bylo do každé jamky přidáno 50 µl 10% BOFES v PBS na 30 minut, aby bylo zabráněno nespecifické vazbě protilátek.

V následujícím kroku bylo přidáno 50 µl/jamku primární myší protilátky proti proteinu E naředěné 1:250 v PBS-T (PBS s 0,05 % Tween-20; Sigma-Aldrich). V jedné sérii pokusů byla použita navíc ještě králičí protilátka proti keratinu (Anti-keratin 14; Biolegend) ředěná 1:250 v PBS-T, aby se odlišily keratinocyty od ostatních buněk. Sklíčka byla inkubována 1 hod ve vlhké komůrce při 37 °C.

Po 1 hod byla sklíčka 3x promyta PBS-T a bylo přidáno opět 50 µl/jamku sekundární anti-myší protilátky (Anti-mouse IgG Fab2, Alexa Fluor 488; Cell Signaling Technology) naředěné v PBS-T v poměru 1:1000. Tato protilátka je fluorescenčně značena, tudíž bylo nutné pracovat mimo přímé světlo. V jedné sérii pokusů byla ještě navíc použita druhá sekundární anti-králičí protilátka (Anti-rabbit IgG Fab2, Alexa Fluor 555; Cell Signaling Technology) naředěná v PBS-T 1:1000. Následovala inkubace 1 hod ve vlhké komůrce při 37 °C.

Po uplynutí inkubace byla sklíčka 1x promyta v PBS-T a bylo přidáno 100 μ l/jamku DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol; Sigma-Aldrich), aby se obarvila jádra. Inkubace trvala 10 min ve vlhké komůrce v termostatu při 37 °C.

Následně byla sklíčka 3x promyta PBS-T a ze sklíček byly odloupnuty plastové jamky. Sklíčka byla osušena a na ně bylo nakápnuto DABCO (2,5% roztok 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu; Ebioscience). Preparát byl překryt krycím sklíčkem.

Preparáty byly poté prohlíženy pod mikroskopem Olympus BX53 vybaveným CCD kamerou (Olympus DP-73). Tímto mikroskopem byla pořízena i fotodokumentace. Současně bylo při prohlížení preparátů vyhodnoceno % pozitivních buněk na TBEV. V každém časovém intervalu bylo vyhodnoceno 10 zorných polí. V jedné sérii pokusů byl preparát prohlížen navíc ještě pod konfokálním mikroskopem Olympus Fluoview FW10i a na export fotografií byl použit program FV10-ASW (ver.04.02).

4 VÝSLEDKY

4.1 DETEKCE VIRU METODOU IFAT V KERATINOCYTECH

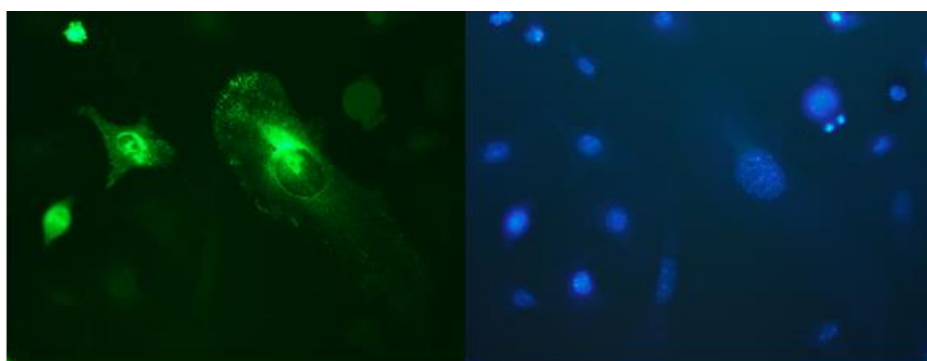
Cílem této série pokusů bylo zjistit, jaké procento infikovaných buněk je pozitivních na TBEV při $MOI = 1$ nebo $MOI = 100$ v různých časových intervalech. Dalším cílem zhodnotit, zda je procento infikovaných buněk vyšší, pokud jsou buňky ovlivněny klíštěcími slinami.

V Tab. I je vyhodnocen první pokus, kdy se poprvé sledovalo, zda virus keratinocyty vůbec infikuje. Z tabulky vyplývá, že určité procento keratinocytů bylo pozitivní na TBEV. Největší procento infikovaných buněk bylo v čase 7 dpi, a to při $MOI = 100$ až dvojnásobné oproti času 1 dpi. V čase 3 dpi je procento infikovaných buněk nižší než v čase 1 dpi.

Tab. I: Množství infikovaných buněk.

Časový interval	MOI	% pozitivních buněk
1 dpi	1	9,3 %
	100	13,4 %
3 dpi	1	4,0 %
	100	5,0 %
7 dpi	1	14,6 %
	100	30,5 %

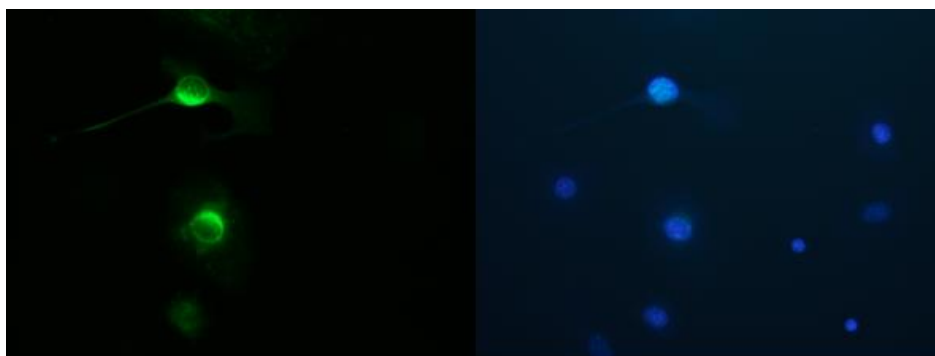
Během tohoto pokusu byla pořízena fotodokumentace, kde zeleně svítí buňky infikované TBEV a modře všechna buněčná jádra keratinocytů. Na Obr.11 jsou keratinocyty infikované při $MOI = 100$, 3 dpi. V levé části obrázku je specifická fluorescence antigenu viru TBE, v pravé stejná část preparátu barvená DAPI, který barví modře pouze jádra buněk.



Obr. 11: Keratinocyty infikované TBEV. Antigen viru (vlevo) a jádra všech buněk (vpravo).

Zvětšení 800x.

Na Obr 12. jsou keratinocyty infikované při MOI = 1, 3 dpi. V levé části obrázku je opět specifická fluorescence antigenu viru TBE, v pravé stejná část preparátu barvená DAPI.



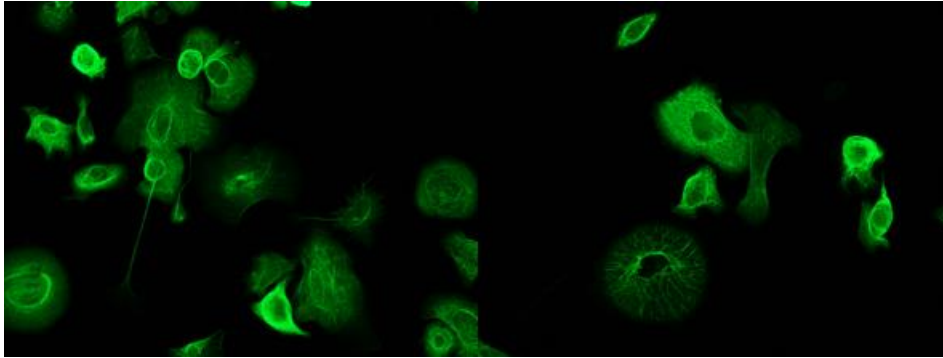
Obr. 12: Keratinocyty infikované TBEV. Antigen viru (vlevo) a jádra všech buněk (vpravo).
Zvětšení 800x.

V další sérii pokusů byl sledován vliv klíštěcích slin na infektivitu viru pro keratinocyty. Buňky byly rozdělené do dvou skupin: bez klíštěcích slin a s klíštěcími slinami v koncentraci 10 μg proteinu/ml. Výsledky imunofluorescence jsou uvedeny v Tab. II. Z tabulky vyplývá, že klíštěcí sliny zvyšují množství infikovaných buněk v každém časovém intervalu. Největší rozdíl je patrný v čase 4 dpi při MOI = 1, kdy je množství pozitivních buněk se slinami téměř 13x větší, než když buňky slinami ovlivněny nebyly.

Tab. II: Vliv klíštěcích slin na procento keratinocytů infikovaných TBEV.

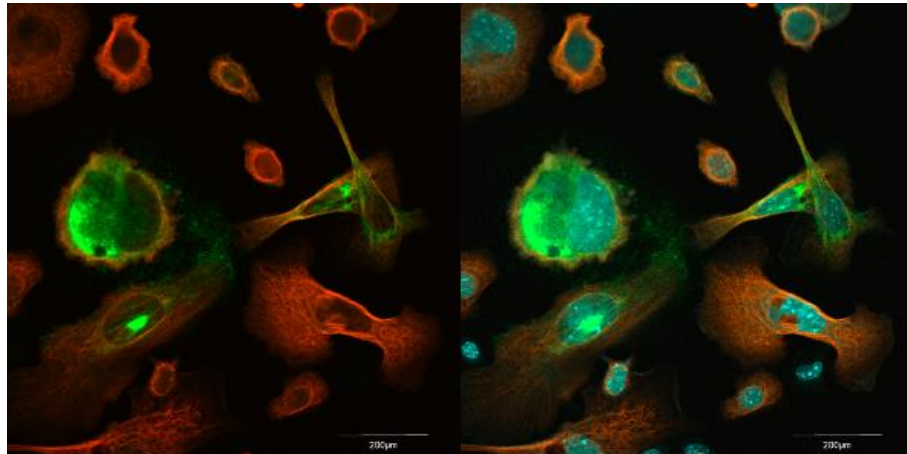
Časový interval	MOI		% pozitivních buněk
1 dpi	1	bez slin	0,01 %
		se slinami	0,10 %
	100	bez slin	0,21 %
		se slinami	1,00 %
4 dpi	1	bez slin	0,10 %
		se slinami	1,24 %
	100	bez slin	0,60 %
		se slinami	3,40 %

Během tohoto pokusu byla použita králičí protilátka proti keratinu, aby bylo potvrzeno, že zobrazené buňky jsou skutečně keratinocyty. To se potvrdilo, protože všechna buněčná jádra, obarvená DAPI, byla jádra keratinocytů (Obr. 13.).

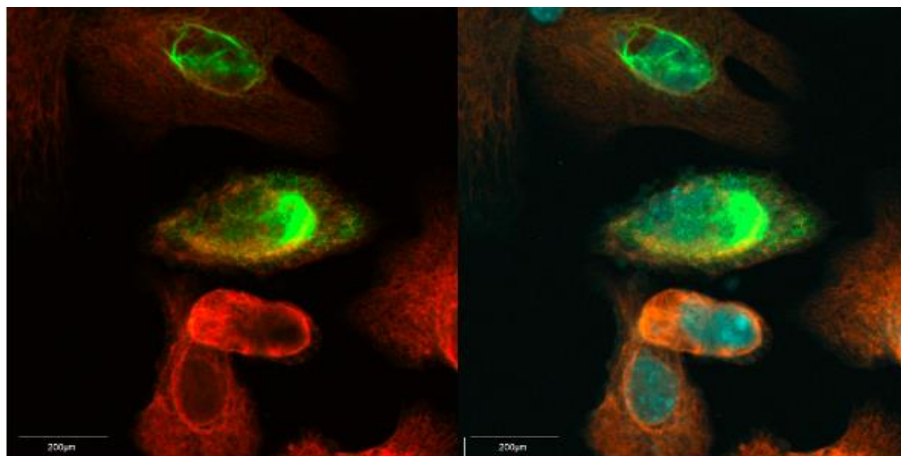


Obr. 13.: Keratinocyty barvené protilátkou proti keratinu. Zvětšení 800x.

Na Obr. 14 a Obr. 15 lze vidět víc značení najednou. Na obrázku je zobrazena stejná část sklíčka, kdy vlevo svítí červeně veškeré keratinocyty a zeleně pouze keratinocyty infikované TBEV (MOI = 100, časový interval 3 dpi). Na obrázku vpravo jsou ještě navíc dobarvena buněčná jádra keratinocytů, která svítí modře.



Obr. 14: Antigen viru TBE v keratinocytech (zelená), keratin (červená) vlevo a zvýrazněná buněčná jádra keratinocytů vpravo. Zvětšení 2000x.

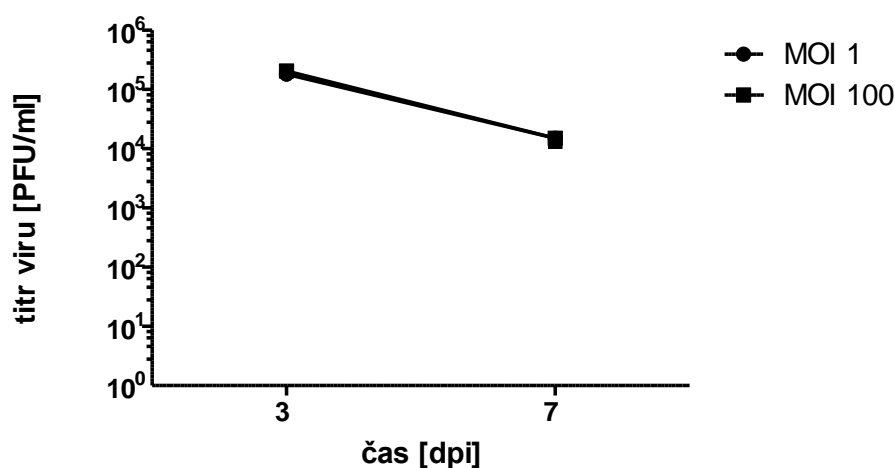


Obr. 15: Antigen viru TBE v keratinocytech (zelená), keratin (červená) vlevo a zvýrazněná buněčná jádra keratinocytů vpravo. Zvětšení 2000x.

4.2 REPLIKACE VIRU TBEV V KERATINOCYTECH

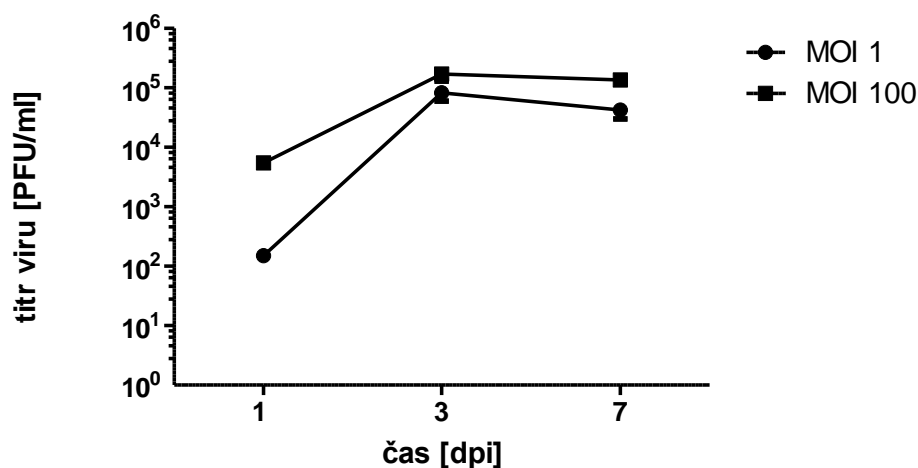
Cílem této série pokusů bylo zjistit, zda se TBEV v keratinocytech replikuje v čase. Tyto pokusy byly prováděny pouze jako předběžné v duplikaci, a proto nebylo možno vyhodnotit statistickou významnost.

V prvním pokusu byla sledována replikace ve dvou časových intervalech: 3 dpi a 7 dpi při dvou infekčních dávkách viru: MOI = 1 a MOI = 100. Z grafu na Obr. 16 vyplývá, že se replikace po čase 3 dpi výrazně snižuje. Rozdíl mezi infekčními dávkami viru není téměř patrný.



Obr. 16: Replikace TBEV v keratinocytech při MOI = 1 a MOI = 100.

V dalším pokusu byla sledována replikace viru ve třech časových intervalech: 1 dpi, 3 dpi a 7 dpi při dvou infekčních dávkách viru: MOI = 1 a MOI = 100. Potvrdilo se, že replikace je nejvyšší v čase 3 dpi a poté se snižuje. V tomto pokusu již rozdíl mezi infekčními dávkami viru je patrný, při MOI 100 dosahuje titer viru vyšších hodnot.

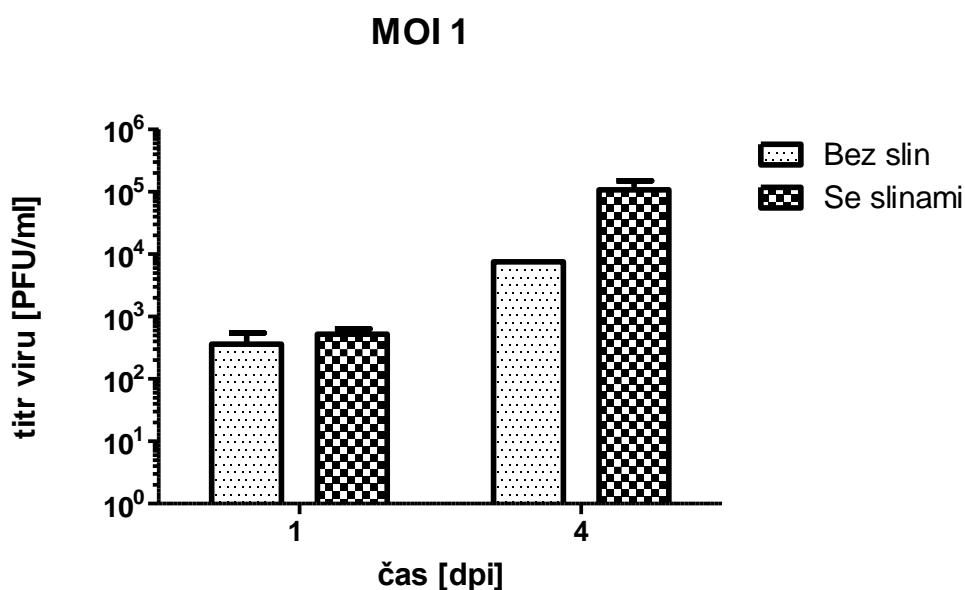


Obr. 17: Replikace TBEV v keratinocytech při MOI = 1 a MOI = 100.

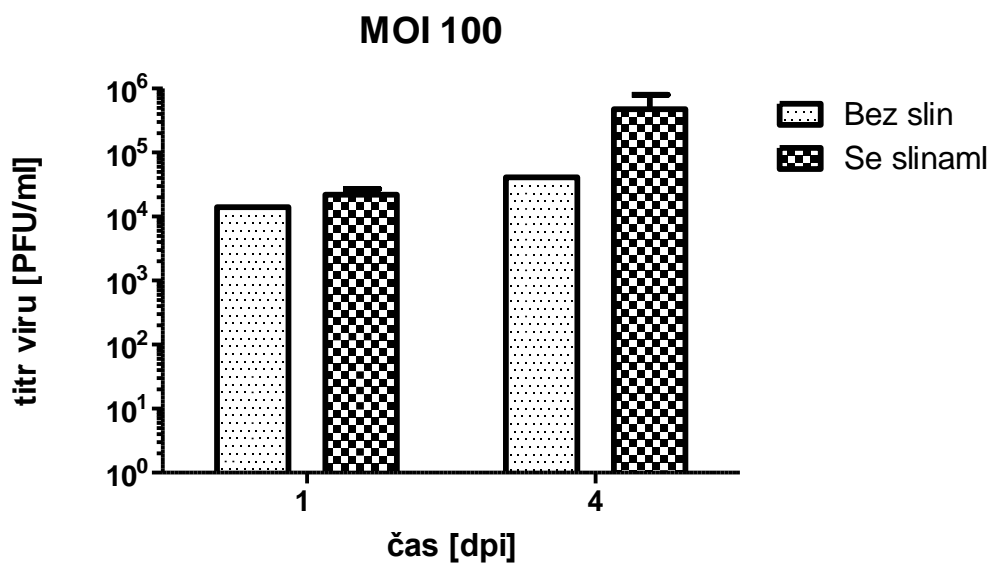
4.2.1 Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech

V poslední sérii pokusů byly keratinocyty rozdělené do dvou skupin: bez klíštěcích slin a s klíštěcími slinami a sledovalo se, zda klíštěcí sliny mají nějaký vliv na replikaci TBEV. Tyto pokusy byly prováděny pouze jako předběžné v duplikaci, a proto nebylo možno vyhodnotit statistickou významnost.

V prvním pokusu byla replikace viru a její ovlivnění klíštěcími slinami sledována ve dvou časových intervalech: 1 dpi a 4 dpi. Z grafů na Obr. 18 a 19 vyplývá, že klíštěcí sliny replikaci viru v keratinocytech zvyšují. Pokus byl opět prováděn při dvou infekčních dávkách viru: MOI = 1 (Obr. 18) a MOI = 100 (Obr. 19). V prvním pokusu (MOI=1) u buněk ovlivněných slinami bylo průměrné množství viru 4 dpi 14x vyšší než u kontrolních, slinami neovlivněných buněk. V dalším pokusu (MOI=100) byl titr viru za 1 dpi vyšší u buněk ovlivněných slinami pouze 2x, za 4 dpi byl efekt slin výraznější, rozdíl mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami byl 12násobný.

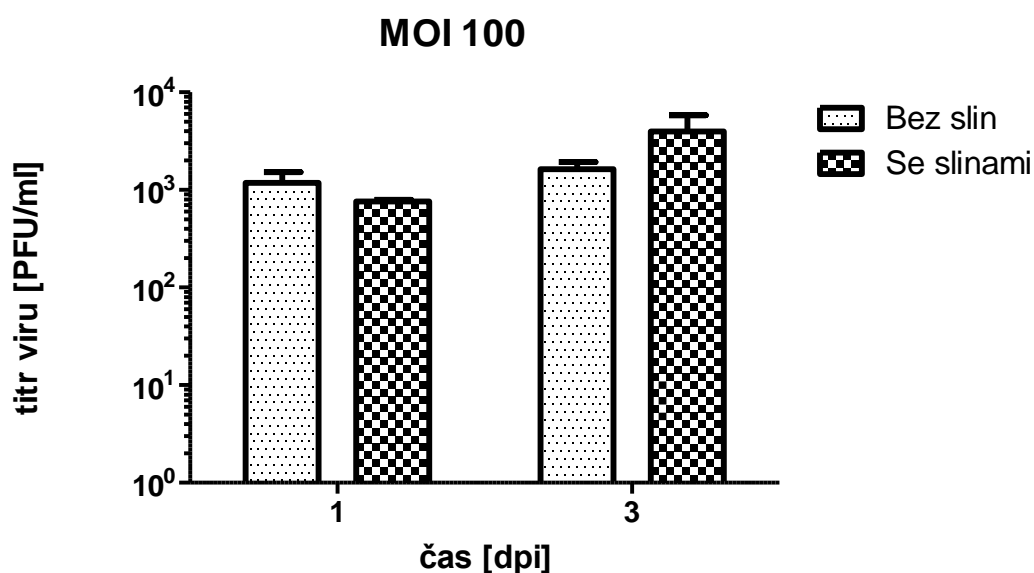


Obr. 18: Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při MOI = 1.



Obr. 19: Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při MOI = 100.

V následujícím pokusu byl pozorován stejný efekt jako v pokusu předchozím, ale byla použita pouze MOI = 100 a časové intervaly 1 dpi, 3 dpi a 7 dpi. Čas 7 dpi vyhodnocený nebyl, jelikož keratinocyty do té doby uhynuly zřejmě z důvodu vyčerpání média. Z grafu na Obr. 20 vyplývá, že v čase 3 dpi se potvrdilo, že klíštěcí sliny zvyšují replikaci viru v keratinocytech 3x, nicméně v čase 1 dpi vyšel efekt opačný.



Obr. 20: Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v keratinocytech při MOI = 100.

5 DISKUZE

TBEV je velmi nebezpečný virus, který je přenášen ve většině případů klíšťaty a hostiteli způsobuje vážnou klíšťovou encefalitidu (Dörrbecker et al., 2010). TBEV se do hostitele dostává prostřednictvím klíštěcích slin, které klíště vylučuje po přisátí na hostitele (Nuttall, 2019). Klíštěcí sliny dokážou tlumit obranyschopnost hostitele i bolest a tím usnadňují sání, aniž by si toho hostitel všiml (Šimo et al., 2017). Klíšťata navíc dovedou potlačit i hemostatické reakce hostitele, které jsou prvním aktivovaným mechanismem jeho obrany proti mechanickému poranění způsobenému vniknutím klíštěte do kůže (Francischetti et al., 2009). V momentě, kdy klíště pronikne prostřednictvím svého hypostomu do epidermis hostitele, TBEV přichází do kontaktu s mnoha důležitými imunitními buňkami vyskytujícími se v kůži (např. dendritické buňky, Langerhansovy buňky, makrofágy atd.) (Wikel et al., 1994; Růžek et al., 2010). Velmi důležitými buňkami pro přenos TBEV jsou keratinocyty, které se vyskytují v epidermis a fungují jako tzv. mechanická kožní bariéra. Dále mají schopnost produkovat celou řadu signálních molekul (tzv. cytokinů) či prezentovat antigen (Feliciani et al., 1996; Bailey et al., 2014; Quaresma, 2019). Navíc jsou keratinocyty jedny z prvních buněk epidermis, se kterými klíště přichází do kontaktu při proniknutí do kůže (Kotál et al., 2015).

Jedním z cílů mé diplomové práce bylo připravit primární kulturu keratinocytů. Vycházeli jsme z publikace Bailey et al. (2014), kde primární kulturu myších keratinocytů připravovali dvojím způsobem: z novorozenech myších mláďat a z ocasu dospělé myši. Tyto dva způsoby přípravy jsou vhodné zejména proto, že novorozená mláďata se rodí holá a myší ocas vykazuje absenci vlasových folikulů v epidermis, které by přípravu keratinocytů velmi komplikovaly. Vzhledem k tomu, že keratinocyty z novorozenech myších mláďat rostou rychleji než keratinocyty z dospělých myší, byla pro tuto práci zvolena příprava primární kultury z novorozenců. Během přípravy primární kultury je zapotřebí keratinocyty postupně promývat a kultivovat ve 3 rozdílných médiích, kdy zejména „Plating“ a Growth média obsahují méně obvyklé složky, jako např. dialyzovaný BOFES, BPE (bovinní fetální sérum, insulin-transferin selenium nebo BSA (bovine serum albumin)). Z důvodu zásadního vlivu vápenatých iontů na diferenciaci keratinocytů (Bikle et al., 2012) bylo použito medium bez Ca^{2+} iontů, dialyzovaný BOFES a nízká koncentrace CaCl_2 . Primární kulturu myších keratinocytů se nám povedlo získat hned několikrát, kdy vždy část buněk byla nasazena na sklíčka či panely a část jich byla zamrazena v tekutém dusíku pro pozdější použití. Ovšem

během pokusů jsme zjistili, že životnost zmražených myších keratinocytů byla poněkud horší v porovnání s těmi, které byly ihned po získání nasazeny na panel.

Dalším mým cílem bylo infikovat keratinocyty TBEV a detekovat ho metodou IFAT. Předpokládalo se, že když jsou keratinocyty prvními buňkami kontaktu při přenosu TBEV z klíštěte na hostitele (Kotál et al., 2015), tak při detekci TBEV v keratinocytech bude potvrzeno určité množství pozitivních buněk. Infekce keratinocytů TBEV a jeho následná detekce se zdařila několikrát a náš předpoklad výskytu pozitivních keratinocytů na TBEV byl potvrzen. V jedné sérii pokusů se dokonce potvrdilo, že největší procento infikovaných buněk bylo v čase 7 dpi až dvojnásobné oproti času 1 dpi (při MOI = 100).

Během pokusů se také podařilo potvrdit, že buňky, které byly získány z myších mláďat, byly opravdu keratinocyty a nikoli jiné kožní buňky. K tomuto potvrzení byla použita primární králičí protilátka proti keratinu a následně sekundární anti-králičí protilátka, která byla imunofluorescenčně značena.

Jako poslední jsme v této sérii pokusů zkoumali, jaký vliv mají klíštěcí sliny na množství pozitivních buněk na TBEV. Klíštěcí sliny mohou v některých případech usnadňovat přenos patogenů do hostitele. Takový způsob přenosu se nazývá slinami asistovaný přenos (SAT effect) a byl poprvé popsán u Thogoto viru (Jones et al., 1990). Vzhledem k tomu, že keratinocyty tvoří více než 90 % buněk epidermis (Lawton, 2019), bylo důležité zjistit, zda klíštěcí sliny ovlivňují i tyto buňky a zvyšují v nich replikaci viru TBE. Jaký konkrétní vliv mají klíštěcí sliny na keratinocyty při infekci TBEV nebylo dosud publikováno, nicméně dříve bylo prokázáno, že např. sliny komára *Aedes aegypti*, který přenáší virus Dengue, zvyšují virovou infekci lidských keratinocytů (Surasombatpattana et al., 2012). V další studii autoři ukázali, že sliny komárů rodu *Aedes* a *Culex*, kteří přenášejí virus západonilské horečky (WNV), mají na antivirovou odpověď keratinocytů inhibiční účinek (Garcia et al., 2018). Během našich pokusů s klíštěcími slinami se potvrdilo, že keratinocyty jsou ovlivněny ve smyslu podpory virové replikace. Bylo prokázáno, že klíštěcí sliny zvyšují množství infikovaných buněk a to např. v čase 4 dpi (MOI = 1) je množství pozitivních buněk se slinami téměř 13x větší, než když buňky slinami ovlivněny nebyly.

Mým posledním cílem bylo potvrdit, že se TBEV v keratinocytech replikuje. Vycházeli jsme z práce Labudy et al. (1996), ve které se jako v jediné publikaci o interakci TBEV a keratinocytů píše. Labuda a spolupracovníci prokázali, že se TBEV v keratinocytech replikuje. Titr TBEV 48 hod po infekci byly 10^7 PFU/ml a po dalších 48 hod se udržovaly téměř na stejných hodnotách. Během našich prvních pokusů bylo jasně prokázáno, že se virus

v keratinocytech replikuje a titer viru byl vždy největší 3. den po infekci. Poté už se titer viru snižoval, což mohlo souviset se stářím kultury a vyčerpáním kultivačního média. V žádném časovém intervalu se nám nepodařilo prokázat tak vysoký titer jako Labudovi et al. (1996), jelikož náš nejvyšší titer viru byl $2,1 \cdot 10^5$ PFU/ml v čase 3 dpi. Všechny pokusy byly ale prováděny pouze jako předběžné, a proto byly pouze v duplikacích. Z toho důvodu žádný ze získaných výsledků nebylo možno statisticky vyhodnotit.

V jedné sérii tohoto pokusu byly buňky navíc opět rozděleny do dvou skupin: bez klíštěcích slin a s klíštěcími slinami, abychom mohli potvrdit, že klíštěcí sliny zvyšují replikaci TBEV v keratinocytech. Tento efekt na keratinocytech doposud prokázána nebyl, ale např. Lieskovská et al. (2018) prokázali, že klíštěcí sliny zvyšují replikaci TBEV v dendritických buňkách. Dendritické buňky v tomto experimentu byly preinkubovány se slinami 2 hod, následně byly infikovány při $MOI = 2$ a titry viru dosahovaly až 10^5 PFU/ml. Z tohoto důvodu se dalo předpokládat, že klíštěcí sliny by mohly zvýšit replikaci TBEV i v keratinocytech. Navíc při imunofluorescenci bylo potvrzeno, že procento infikovaných buněk ovlivněných klíštěcími slinami bylo výrazně vyšší. Během našich pokusů se keratinocyty se slinami preinkubovaly 1 hod a v několika prvních pokusech byly keratinocyty infikovány při $MOI = 1$ a $MOI = 100$. V posledních pokusech se ale keratinocyty infikovaly už pouze při $MOI = 100$. Zvýšená replikace viru v keratinocytech ovlivněných klíštěcími slinami byla potvrzena, a to v čase 3 dpi i 4 dpi, nicméně v čase 1 dpi se tento efekt prokázat nepodařilo, jelikož v tomto časovém intervalu byla vyšší replikace v buňkách bez klíštěcích slin. Pozdější časové intervaly v těchto pokusech již vyhodnoceny nebyly, protože buňky ve většině případů do 7 dpi uhynuly zřejmě z důvodu vyčerpání média. Náš největší titer viru byl $4,8 \cdot 10^5$ PFU/ml v čase 3 dpi při $MOI = 100$. Bohužel i v této sérii pokusů byly všechny pokusy prováděny pouze jako předběžný výzkum, a proto byly pouze v duplikacích. Z toho důvodu žádný ze získaných výsledků není statisticky signifikantní.

Výzkum interakce TBEV a kožních keratinocytů by bylo potřeba do budoucna doplnit o informace, jakým mechanismem klíštěcí sliny ovlivňují replikaci TBEV v keratinocytech. Vzhledem k tomu, že např. Surasombatpattana et al. (2012) potvrdili, že sliny komára *Aedes aegypti* zvyšují replikaci DENV v lidských keratinocytech potlačením exprese interferonu, dá se předpokládat, že klíštěcí sliny by tento efekt mohly mít také. K podobnému zjištění přišli i Hajnická et al. (2000), kteří prokázali, že sliny z klíštěčů *Ixodes ricinus* inhibují antivirové působení interferonu v myších fibroblastech. Další pokusy by měly objasnit, jakou roli v interakci TBEV a keratinocytů mají buněčné exosomy. Zhou et al. (2018) prokázali, že virus

Langat je schopný infikovat keratinocyty prostřednictvím buněčných exosomů, je pravděpodobné, že by TBEV mohl mít stejnou schopnost a mohl by keratinocyty infikovat stejným způsobem. Poté by bylo velmi přínosné osvětlit apoptózu keratinocytů v souvislosti s klíštěcími slinami pomocí detekce enzymů Akt (proteinkináza B), která je součástí signalizační dráhy PI3K/Akt a kaspázy 3, která u buněk aktivuje samotný proces apoptózy. Dále by bylo na místě se zaměřit i na přežívání keratinocytů, které úzce s apoptózou souvisí. Lieskovská et al. (2018) prokázali, že aktivace PI3K/Akt dráhy u dendritických buněk infikovaných TBEV je klíštěcími slinami silně zesílena, tudíž existuje možnost, že u keratinocytů tomu bude stejně. Aktivace této signální dráhy je jednou ze strategií, jak viry dokážou oddálit apoptózu infikované buňky. Vzhledem k tomu, že jsou viry při replikaci závislé na hostitelské buňce, prodlužují oddálením apoptózy dané buňky svou vlastní replikaci (Diehl & Schaal, 2013). Tuto vlastnost mají i flaviviry (např. vir Dengue nebo virus japonské encefalitidy), které jsou schopny PI3K/Akt dráhu aktivovat. Případné blokování signalizace PI3K pak vede k dřívější indukci apoptózy hostitelské buňky (Lee et al., 2005). Ovlivnění apoptózy bylo v práci Lieskovská et al. (2018) zkoumáno pomocí enzymů Akt a kaspázy 3, kde bylo ještě k tomu testováno přežívání buněk. Zjistili, že procento dendritických buněk infikovaných TBEV pozitivních na kaspázu 3 bylo spíše malé, ale přesto byl v buňkách ovlivněnými slinami zjištěn významný pokles apoptózy. Jelikož se během našich pokusů potvrdilo, že klíštěcí sliny ovlivňují replikaci TBEV v keratinocytech, je na místě se zamyslet, zda by se u keratinocytů nemohlo za přítomnosti slin také objevit zvýšené přežívání buněk a zároveň snížená apoptóza, jak tomu bylo i u dendritických buněk (Lieskovská et al., 2018).

6 ZÁVĚR

- Byla zvládnuta metoda přípravy primární kultury myších keratinocytů.
- Antigen viru TBE se v keratinocytech podařilo detekovat imunofluorescencí.
- Replikace TBEV v keratinocytech byla potvrzena.
- Klíštěcí sliny zvyšovaly procento infikovaných keratinocytů a zároveň v keratinocytech podporovaly replikaci TBEV.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPs	antimikrobiální peptidy
ATB	antibiotika
BOFES	bovinní fetální sérum
BPE	bovine pituitary extract
BSA	bovine serum albumin
CNS	centrální nervová soustava
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dDC	kožní dendritické buňky (z angl. dermal dendritic cell)
DENV	virus Dengue
DETC	dendritické epidermální T-lymfocyty
dpi	dny po infekci
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor)
ER	endoplazmatické retikulum
HBSS	z angl. Hank's Balanced Salt Solution
hpi	hodiny po infekci
IFAT	z angl. Indirect Immunofluorescence Antibody Test
IL	interleukin
INF	interferon
LCs	Langerhansovy buňky (z angl. Langerhans cells)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MOI	multiplicita infekce (z angl. multiplicity of infection)
PAMPs	z angl. pathogen-associated molecular patterns
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS s 0,05 % Tween-20
prM	prekurzor membránového proteinu M
PTS	prekolostrálního telecí sérum

ROS	reaktivní formy kyslíku
SAT	slinami aktivovaný přenos (z angl. saliva-activated transmission)
TBE	klíšťová encefalitida (z angl. tick-borne encephalitis)
TBEV	virus klíšťové encefalitidy (z angl. tick-borne encephalitis virus)
TCR	T buněčný receptor
TNF	faktor nádorové nekrózy (z angl. tumor necrosis factor)
WNV	virus západonilské horečky (z angl. West Nile virus)

8 SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

¹ <https://neuronewsnight.com/2017/04/11/neurotropic-flaviviruses-april-20-2017/>

² <https://www.liverpool.ac.uk/infection-and-global-health/research/zoonotic-infections/tick-activity-project/uk-ticks/>

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bailey, L. J., Choudhary, V., Merai, P., & Bollag, W. B. (2014). Preparation of primary cultures of mouse epidermal keratinocytes and the measurement of phospholipase D activity. *Methods in Molecular Biology*, 1195.

Banerjee, G., Damodaran, A., Devi, N., Dharmalingam, K., & Raman, G. (2004). Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59, 385–394.

Barbieri, J. S., Wanat, K., & Seykora, J. (2014). Skin: Basic Structure and Function. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. 1134–1144.

Bartíková, P., Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2020). Ticks and the effects of their saliva on growth factors involved in skin wound healing. *Journal of Venom Research*, 10, 45–52.

Bernard, Q., Gallo, R. L., Jaulhac, B., Nakatsuji, T., Luft, B., Yang, X., & Boulanger, N. (2016). Ixodes tick saliva suppresses the keratinocyte cytokine response to TLR2/TLR3 ligands during early exposure to Lyme borreliosis. *Experimental Dermatology*, 25, 26–31.

Bikle, D. D., Xie, Z., & Tu, C. L. (2012). Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 7(4), 461–472.

Blom, K., Cuapio, A., Sandberg, J. T., Varnaite, R., Michaëlsson, J., Björkström, N. K., Sandberg, J. K., Klingström, J., Lindquist, L., Gredmark Russ, S., & Ljunggren, H. G. (2018). Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 2174.

Bogovic, P., Lotric-Furlan, S., & Strle, F. (2010). What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 246–250.

Bonnet, S., Kazimírová, M., Richardson, J., & Šimo, L. Chapter 5 - Tick Saliva and Its Role in Pathogen Transmission. In Boulanger, N. (ed.), *Skin and Arthropod Vectors*, 1. vydání, London: Academic Press, 2018, 121-191, ISBN 9780128114360.

- Bourée, P., Delaigue, S., & Ensaf, A. (2015). Tick-borne encephalitis. *Medecine Therapeutique Pediatrie*, 18, 145–151.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cook, P. C., Aynsley, S. A., Turner, J. D., Jenkins, G. R., van Rooijen, N., Leeto, M., Brombacher, F., & Mountford, A. P. (2011). Multiple helminth infection of the skin causes lymphocyte hypo-responsiveness mediated by Th2 conditioning of dermal myeloid cells. *PLoS Pathogens*, 7.
- Cruz, M. S., Diamond, A., Russell, A., & Jameson, J. M. (2018). Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in skin immunity and disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–13.
- Delavary, B. M., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B., & Beelen, R. H. J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216, 753–762.
- Diehl, N., & Schaal, H. (2013). Make yourself at home: Viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses*, 5, 3192–3212.
- Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M., & Hufert, F. T. (2010). Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 213–222.
- Dumpis, U., Crook, D., & Oksi, J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28, 882–890.
- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., & Heinz, F. X. (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80, 179–185.
- Feliciani, C., Gupta, A. K., & Sauder, D. N. (1996). Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 7, 300–318.

- Francischetti, I. M. B., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., & Ribeiro, J. M. C. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 2051–2088.
- Garcia, M., Alout, H., Diop, F., Damour, A., Bengue, M., Weill, M., Missé, D., Lévêque, N., & Bodet, C. (2018). Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 387.
- Garcia, M., Alout, H., Diop, F., Damour, A., Bengue, M., Weill, M., Missé, D., Lévêque, N., & Bodet, C. (2018). Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 387.
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14, 392–404.
- Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57,129-46.
- Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88, 1–12.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Apamaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Shao, R., & Barker, S. C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2528:1–28.
- Hajnická, V., Kocakova, P., Slovak, M., Labuda, M., Fuchsberger, N., & Nuttall, P. A. (2000). Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunology*, 22, 201–206.
- Hermance, M. E., & Thangamani, S. (2020). Utilization of RNA in situ Hybridization to Understand the Cellular Localization of Powassan Virus RNA at the Tick-Virus-Host Interface. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–9.

- Hermant, P., & Michiels, T. (2014). Interferon- λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications. *Journal of Innate Immunity*, 6, 563–574.
- Chessa, C., Bodet, C., Jousselin, C., Wehbe, M., Lévêque, N., & Garcia, M. (2020). Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–15.
- Jacobsen, E. A., Helmers, R. A., Lee, J. J., & Lee, N. A. (2012). The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*, 120, 3882–3890.
- Jones, L. D., Davies, C. R., Williams, T., Gory, J., & Nuttall, P. A. (1990). Non-viraemic transmission of Thogoto virus: vector efficiency of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 846–848.
- Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: Their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 1–19.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58–68.
- Labuda, M., Austyn, J. M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J., & Nuttall, P. A. (1996). Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 219, 357–366.
- Lawton, S. (2019). Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nursing Times*, 115,30–33.
- Lee, C.-J., Liao, C.-L., & Lin, Y.-L. (2005). Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *Journal of Virology*, 79, 8388–8399.
- Li, F., Adase, C. A., & Zhang, L. J. (2017). Isolation and culture of primary mouse keratinocytes from neonatal and adult mouse skin. *Journal of Visualized Experiments*, 125, 56027.

- Lieskovská, J., Páleníková, J., Langhansová, H., Chmelař, J., & Kopecký, J. (2018). Saliva of *Ixodes ricinus* enhances TBE virus replication in dendritic cells by modulation of pro-survival Akt pathway. *Virology*, 514, 98–105.
- Lim, P.-Y., Behr, M. J., Chadwick, C. M., Shi, P.-Y., & Bernard, K. A. (2011). Keratinocytes Are Cell Targets of West Nile Virus In Vivo. *Journal of Virology*, 85, 5197–5201.
- Lindquist, L., & Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet*, 371, 1861–1871.
- Long, H., Zhang, G., Wang, L., & Lu, Q. (2016). Eosinophilic skin diseases: A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 50, 189–213.
- López-González, M., Meza-Sánchez, D., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J., Vélez-Del Valle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Jiménez, T., Flores-Romo, L., Santos-Argumedo, L., Gutiérrez-Castañeda, B., & Cedillo-Barrón, L. (2018). Human keratinocyte cultures (HaCaT) can be infected by DENV, triggering innate immune responses that include IFN λ and LL37. *Immunobiology*, 223, 608–617.
- López-González, M., Meza-Sánchez, D., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J., Vélez-Del Valle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Jiménez, T., Flores-Romo, L., Santos-Argumedo, L., Gutiérrez-Castañeda, B., & Cedillo-Barrón, L. (2018). Human keratinocyte cultures (HaCaT) can be infected by DENV, triggering innate immune responses that include IFN λ and LL37. *Immunobiology*, 223, 608–617.
- MacLeod, A. S., & Havran, W. L. (2011). Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2399–2408.
- Mandary, M. B., Masomian, M., & Poh, C. L. (2019). Impact of RNA virus evolution on quasispecies formation and virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4657.
- Mandl, C. W. (2005). Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*, 111, 161–174.
- Matejuk, A. (2018). Skin Immunity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66, 45–54.
- Miller, L. S. (2008). Toll-Like Receptors in Skin. *Advances in Dermatology*, 24, 71–87.

- Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2016). Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circulation Research*, 119, 414–417.
- Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1–53.
- Nuttall, P. A. (2019). Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener Klinische Wochenschrift*. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y>
- Nuttall, P. A., & Labuda, M. (2004). Tick-host interactions: Saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129.
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., & Kaufman, W. R. (1994). Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of Medical Entomology*, 31, 1–9.
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14, 289–301.
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–26.
- Pulkkinen, L. I. A., Butcher, S. J., & Anastasina, M. (2018). Tick-borne encephalitis virus: A structural view. *Viruses*, 10, 1–20.
- Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 32, 1–35.
- Rajesh, A., Wise, L., & Hibma, M. (2019). The role of Langerhans cells in pathologies of the skin. *Immunology and Cell Biology*, 97, 700–713.
- Růžek, D., Dobler, G., & Mantke, O. D. (2010). Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 223–232.
- Sabat, R., Wolk, K., Loyal, L., Döcke, W. D., & Ghoreschi, K. (2019). T cell pathology in skin inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 41, 359–377.

Surasombatpattana, P., Patramool, S., Luplertlop, N., Yssel, H., & Missé, D. (2012). *Aedes aegypti* saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 2103–2105.

Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., & Bonnet, S. I. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–23.

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

Wikel, S. K., Ramachandra, R. N., & Bergman, D. K. (1994). Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, 24, 59–66.

Zhou, W., Woodson, M., Neupane, B., Bai, F., Sherman, M. B., Choi, K. H., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2018). Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells. *PLoS Pathogens*, 14.