

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

**Vliv klíčtějších slin na žírné buňky na úrovni signálních  
drah.**

Diplomová práce

**Bc. Barbora Hejdová**

Školitelka: Mgr. Jaroslava Liesková, PhD.

České Budějovice 2016

Magisterská diplomová práce

Hejdová, B., 2016: Vliv klíštěcích slin na žírné buňky na úrovni signálních drah. [The effect of tick saliva on signalling pathways in mast cells. Mgr. Thesis, in Czech] – 79 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Annotation

Intracellular signalling molecules create the signalling cascades which enable the transfer of the signal to the cell. In this work we have studied the influence of tick saliva on the cytokine production and the activation of signalling pathways in ionomycin stimulated murine mast cells. We found out that tick saliva inhibits production of several cytokines and affects two important signalling pathways in mast cells possibly involved in the regulation of cytokine induction.

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

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

V Českých Budějovicích, 9. 12. 2016

.....

Barbora Hejdová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. V první řadě děkuji své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, PhD. za vedení práce, veškeré rady a pomoc s experimenty a především za trpělivost a ochotu, kterou mi po celou dobu věnovala. Dále děkuji RNDr. Janě Páleníkové za její rady a připomínky a také za pomoc s experimenty. Děkuji paní Bc. Evě Výletové za velkou ochotu a veškerou pomoc zejména při práci s buňkami. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat kolegyni a přítelkyni Elišce Maršákové, která mi ochotně pomáhala nejen v laboratoři.

Nakonec bych chtěla poděkovat také své rodině za podporu v průběhu celého studia.

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Žírné buňky.....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Vývoj a klasifikace.....	2
2.1.2	Distribuce a růstové faktory .....	4
2.1.3	Funkce .....	4
2.1.4	Aktivace .....	6
2.1.5	Mediátory .....	7
<b>2.2</b>	<b>Klíště .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Klíštěcí sliny.....	10
2.2.2	Vliv klíštěcích slin na žírné buňky .....	12
<b>2.3</b>	<b>Vybrané signální molekuly a jejich funkce .....</b>	<b>13</b>
2.3.1	ERK1/2 MAP kináza.....	13
2.3.2	p38 MAP kináza.....	16
2.3.3	Akt (PI3K/Akt).....	17
2.3.4	NF- $\kappa$ B.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiály .....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Myši .....	24
3.1.2	Klíšťata a sliny .....	24
3.1.3	Žírné buňky .....	24
<b>3.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Slintání klíšťat .....	25
3.2.2	Izolace BMMC.....	26
3.2.3	Příprava buněk .....	26
3.2.4	Detekce cytokinů a chemokinů v aktivovaných žírných buňkách.....	27
3.2.5	Sledování aktivity signálních molekul .....	29
3.2.6	Statistické vyhodnocení dat.....	32
<b>4</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Ovlivnění produkce cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami.....</b>	<b>34</b>

5.2	Ovlivnění signálních molekul v žirných buňkách .....	38
6	DISKUZE .....	47
6.1	Ovlivnění produkce cytokinů a chemokinů primárními žirnými buňkami.....	47
6.2	Ovlivnění signálních molekul v žirných buňkách .....	49
7	ZÁVĚR .....	52
8	SEZNAM ZKRATEK.....	53
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	55

# 1 Úvod

Žírné buňky vznikají při hematopoéze, což je proces maturace a diferenciacie kmenových buněk kostní dřeně na buňky jednotlivých krevních řad. Běžně žírné buňky najdeme ve tkáních či sliznicích, kde přetrvávají. Toto umístění se zdá být velice důležité pro jejich správnou funkci. Žírné buňky zde totiž „čekají“ na setkání s antigenem, aby tak mohly rychle reagovat. Tyto buňky hrají zásadní roli při astmatu, alergiích či anafylaktických reakcích, kdy dochází k jejich nadměrné aktivaci a následnému vyplavení biologicky aktivních látek z jejich granul.

V posledních letech se ukázalo, že žírné buňky nezpůsobují jen výše zmíněné stavy, ale hrají důležitou roli také při modulaci jak vrozené, tak získané imunity. Jsou schopné ovlivňovat imunitní reakci pozitivně i negativně. Právě toho využívá i klíště, které prostřednictvím slin, jež vypouští do rány, ovlivňuje imunitní buňky a brání jim v uskutečňování svých funkcí. Žírné buňky, které jsou mezi prvními buňkami, jež přijdou se slinami do styku, jsou tak vhodným potenciálním cílem. Klíště se snaží modulovat imunitní reakci tak, aby mohlo dokončit sání a úspěšně pokračovat ve vývoji. Proniknutí do mechanismu buněčných signalizací, které jsou klíčové v řízení pochodů v žírných buňkách, se proto zdá být nezbytné k pochopení těchto imunomodulačních jevů. Nahlédnutí do této problematiky by nám mohlo pomoci k pochopení strategií, které klíště využívá a následně také v obraně proti nim.

## 2 Literární přehled

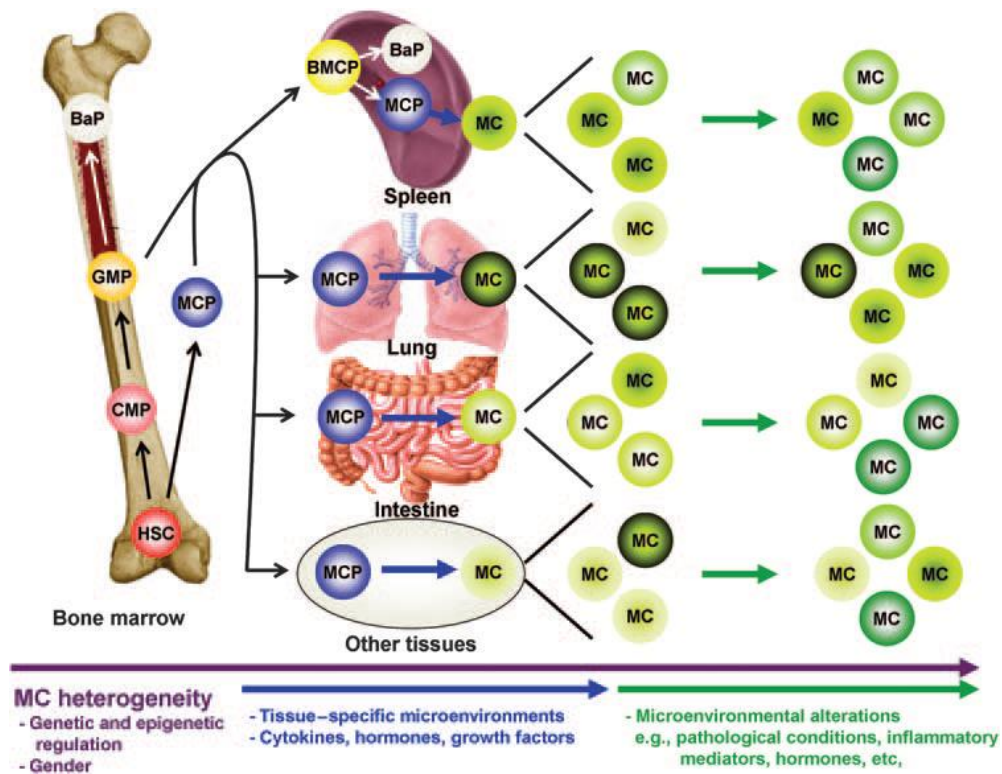
### 2.1 Žírné buňky

Žírné buňky byly identifikovány roku 1863 doktorem von Recklinghausenem jako granulární buňky v mesenteriu žab (Bloom 1984). Později Paul Ehrlich popsal anilin-pozitivní buňky v pojivových tkáních. Zjistil, že granula těchto buněk obsahují jisté látky, které reagují s anilinovým barvivem. Pojmenoval je „mastzellen“, neboli mastocyty, jelikož se domníval, že díky svým granulím mají nutriční funkci (Ehrlich 1877). Pozdější významné objevy histaminu, leukotrienů a IgE protilátek poskytly počáteční pohled na roli žírných buněk v alergických reakcích.

#### 2.1.1 Vývoj a klasifikace

Lidské žírné buňky vznikají z  $CD34^+/CD117^+/CD13^+$  multipotentních hematopoetických progenitorových buněk v kostní dřeni (Kirshenbaum et al. 1991, 1992, 1999), krví migrují do tkání a v cirkulaci obvykle nejsou přítomny ve zralém stavu. K diferenciaci a maturaci dochází až lokálně po nacestování prekurzorů do vaskularizovaných tkání a to pod vlivem mikroprostředí (Ehrlich 1878; Kitamura 1989). Obrázek 1 znázorňuje současný model vývoje žírných buněk.

Hlavní fenotypová klasifikace je na slizniční žírné buňky (MMC<sub>S</sub>) a žírné buňky pojivových tkání (CT-MC<sub>S</sub>) (Aldenberg & Enerbäck 1985, Enerbäck & Lundin 1974). MMC<sub>S</sub> se mohou diferencovat do CT-MC<sub>S</sub> a naopak prostřednictvím vlivu mikroprostředí. Fenotyp MC<sub>S</sub> je tedy určen okolní tkání (Kitamura et al. 1987). Slizniční žírné buňky u potkanů přednostně exprimují myší MC proteázu (MMCP) 1 a 2, zatímco žírné buňky z pojivových tkání exprimují MMCP-4, 5 a 6 a karboxypeptidázu A (Kitamura 1989). Lidské žírné buňky se také vyznačují heterogenitou a klasifikujeme je podle obsahu serinových proteáz. Rozlišujeme tak žírné buňky obsahující jen tryptázu (MC<sub>T</sub>), jen chymázu (MC<sub>C</sub>) a tryptázu i chymázu (MC<sub>TC</sub>) (Irani et al. 1986; Weidner & Austen 1993).



**Obrázek 1:** Současný model vývoje a heterogenity žírných buněk (převzato z Moon et al. 2010).

○ Povrchové markery

Stejně jako všechny krevní buňky i žírné buňky mají na svém povrchu specifické molekuly. Tyto molekuly mohou být využity k identifikaci a typizaci žírných buněk. Jedná se především o vysoce afinitní receptor  $Fc_\epsilon RI$ , CD117 (c-kit) neboli SCFR – receptor pro stem cell faktor. Na zralých žírných buňkách lze také najít CD34 molekulu (Drew et al. 2002) a také receptory pro IgG ( $Fc_\gamma R$ ). MC také exprimují MHC I a II molekuly a bylo uvedeno, že jsou tak schopné zpracovat a prezentovat antigen *in vitro* (Mekori & Metcalfe 1999).

Pravděpodobně nejdůležitější specifickou povrchovou molekulou žírných buněk je zmíněný vysoce afinitní receptor  $Fc_\epsilon RI$ , jelikož je rozhodující pro zahájení alergické reakce. Jedná se o tetramerický receptor pro Fc oblast imunoglobulinů třídy E (IgE) (Miller et al. 1989). Je exprimován na povrchu nejen žírných buněk, ale i bazofilních granulocytů. Velmi známý je také c-kit. Jedná se o tyrozin-kinázový receptor, jehož ligandem je faktor kmenových buněk (SCF nebo též kit ligand). Navázáním SCF na receptor dochází k potlačení apoptózy a tím k regulaci přežívání buněk, jež tento receptor exprimují. SCF také udržuje žírné buňky ve tkáních (Iemura et al. 1994; Zsebo et al. 1990).



### 2.1.2 Distribuce a růstové faktory

Žírné buňky jsou v těle dobře distribuovány a najdeme je v různých tkáních. Převážně se jedná o kůži nebo sliznici gastrointestinálního či respiračního traktu, kde je rozhraní mezi hostitelským a vnějším prostředím a tudíž je to místo možného vstupu patogenů či kontaktu se škodlivými látkami. Zde následně mastocyty přetrvávají (Ehrlich 1878; Kitamura 1989).

Cévní adhezivní molekuly, jež interagují s integriny, mají zásadní význam pro distribuci progenitorů žírných buněk. Například integrin  $\alpha 4\beta 7$  interaguje se slizniční adhezivní molekulou MAdCAM-1 a vaskulární adhezivní molekulou VCAM-1 a pomáhá tak udržovat cirkulující progenitory MC (MCp) v tenkém střevě. Bylo pozorováno, že myši, které měly deficit VCAM-1 nebo jim byly podány protilátky proti této molekule, vykazovaly výrazně nižší koncentrace střevních MCp. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití protilátek proti MAdCAM-1. Důležitost VCAM-1 byla testována také při zánětu plic. Opět měla zásadní vliv na migraci progenitorů MC, nicméně klíčovým integrinem, který interagoval s VCAM-1, byl v tomto případě  $\alpha 4\beta 1$  (Abonia et al. 2005, 2006). Můžeme tedy říci, že tyto molekuly hrají velmi důležitou roli při směřování vyplavených progenitorových žírných buněk do místa potřeby.

Jak již bylo zmíněno, na vývoj žírných buněk má vliv mikroprostředí. Nicméně existuje i několik specifických molekul, jež ovlivňují jejich fenotyp. Po izolaci a charakterizaci faktoru kmenových buněk (SCF) v roce 1990 (Zsebo et al. 1990), který je produkován převážně buňkami stromatu, bylo v roce 1992 uvedeno, že SCF je hlavní růstový faktor pro žírné buňky odvozené od CD34<sup>+</sup> (Kirshenbaum et al. 1992). U myši je dalším klíčovým faktorem IL-3 (Lantz et al. 1998). Jsou ale i další molekuly, jež podporují proliferaci a diferenciaci jak myších tak lidských MC. Jedná se o IL-4, 9 a 10 a zdá se, že optimální pro růst MC je kombinace interleukinů 3, 4 a 10 produkovaná aktivovanými T buňkami (Ishizaka et al. 1993; Thompson-Snipes et al. 1991). NGF neboli nervový růstový faktor pak předchází apoptóze žírných buněk (Horigome et al. 1994).

### 2.1.3 Funkce

Klasicky jsou žírné buňky chápány jako efektorové buňky alergických reakcí zprostředkovaných IgE. Podporují při nich zánět a jiné tkáňové změny. Avšak mají různé

funkce v mnoha fyziologických a patofyziologických reakcích. Jsou například zapojeny do řízení homeostázy (Gurish & Austen 2001), hojení ran (Ng 2010) či remodelace kostí (Silberstein et al. 1991). Pro účely této práce jsou však podstatné role, jež hrají v imunitních reakcích. Jsou zásadními buňkami v hypersenzitivních reakcích typu 1 (von Ruedorffer et al. 2003) a kromě jejich významné funkce při IgE reakcích jsou zapojeny do různých procesů vrozené a získané imunity. Jejich umístění jim umožňuje rychle detekovat a zahájit reakci proti napadajícím mikrobům. Různé patogeny a jejich produkty aktivují MC prostřednictvím jejich receptorů (TLR, FcR, komplementové receptory), což umožňuje žírným buňkám reagovat přímo na tyto stimuly. Kromě likvidace patogenů mohou degradovat potenciálně toxické složky jedů (Metz et al. 2006).

V časně reakci uvolní MC předem syntetizované mediátory (histamin, heparin, proteázy a chemotaktické faktory), které „nabírají“ efektorové buňky, převážně neutrofilů, které pak napomáhají při prvotním odstraňování patogenů. Uvolnění konkrétních mediátorů je závislé na síle a typu aktivačního stimulu. Mediátory pak uskutečňují své protizánětlivé účinky prostřednictvím interakce s různými cílovými buňkami.

### **2.1.3.1 Imunomodulace**

Velice důležitou funkcí žírných buněk, kromě jejich přímého vlivu na okolní buňky a tkáň, je imunomodulace. Jedná se o ovlivňování imunitní odpovědi prostřednictvím ostatních imunokompetentních buněk jako jsou NK buňky, dendritické buňky, monocyty, T a B buňky, granulocyty, ale také endoteliální a epiteliální buňky (Galli et al. 2008). Tyto imunomodulační a imunoregulační funkce zprostředkovávají MC přes prakticky všechny mediátory, jež jsou schopné syntetizovat.

- **Negativní imunomodulace**

Negativní imunomodulační účinky zahrnují protizánětlivé a imunosupresivní účinky žírných buněk. Realizují je zejména díky produkci IL-10. Tento interleukin potlačuje například produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů u T-buněk, monocytů a keratinocytů a také díky svému působení zlepšuje schopnost dendritických buněk redukovat proliferaci T-buněk a jejich produkci cytokinů (shrnutí v Galli et al. 2008).

- Pozitivní imunomodulace

Žírné buňky podporují migraci, maturaci, diferenciaci a funkci imunitních buněk prostřednictvím sekrece faktorů jako jsou TNF- $\alpha$ , chemokiny, histamin, LTB4 a proteázy. Mimo jiné také prezentují antigeny T-buňkám prostřednictvím MHC molekul (Fox et al. 1994; Kambayashi et al. 2008) a podporují produkci IgE B-buňkami (přes IL-4, 5, 6, 13 a CD40L). Díky produkci TNF- $\alpha$  a jiných mediátorů, které up-regulují expresi adhezivních molekul na vaskulárních buňkách, podporují žírné buňky také nábor imunitních buněk. V neposlední řadě mohou MC podporovat i Th<sub>2</sub> odpověď a to prostřednictvím prostaglandinu D2, který působí na maturaci dendritických buněk (Galli et al. 2008; Xue et al. 2005).

#### 2.1.4 Aktivace

Aktivace žírných buněk je pro jejich funkci klíčová. Následuje ji celá řada pochodů řízených složitými signalizačními drahami vedoucí k degranulaci, tedy uvolnění biologicky aktivních látek z granul a také k syntéze dalších látek *de novo*.

Žírné buňky mohou být aktivovány různými podněty. Nejznámějším je aktivace prostřednictvím již zmíněného vysoce afinitního Fc<sub>ε</sub>RI receptoru, jež mají MC na svém povrchu (Ishizaka & Ishizaka 1967). Navázání Fc oblasti IgE na tento Fc<sub>ε</sub> receptor samo o sobě neprodukuje žádný zjevný signál. K aktivaci je nutné protilátku na receptoru přemostit, což znamená navázání multivalentních antigenů na komplex IgE-receptor na povrchu buňky. Kromě komplexu antigen-IgE může Fc<sub>ε</sub> receptor přemostit i anti-IgE protilátka. Teprve pak dojde ke konformačním změnám v receptoru, což následně vyvolá řadu intracelulárních signálních kaskád (Ishizaka & Ishizaka 1971; Yano et al. 1997; Metzger et al. 1986).

MC mohou být nicméně aktivovány i jinými neimunologickými mechanismy nezávislými na Fc<sub>ε</sub>RI receptoru. Mezi ně patří například neuropeptidy, složky komplementu nebo některé léky (Metcalfé et al. 1997). Dalším příkladem je aktivace přes CD48 molekulu (Muñoz et al. 2003), nebo pomocí IgG protilátek přes vysoce afinitní IgG receptor Fc<sub>γ</sub>RI (Tkaczyk et al. 2002) či aktivace přes Toll-like receptory, která ovšem nevede k degranulaci MC, ale pouze k produkci cytokinů (Okumura et al. 2003; Varadaradjalou et al. 2003). Další možností je aktivace pomocí Nod-like receptorů či

lektinů typu C (Urb & Sheppard 2012) a aktivaci může vyvolat také endothelin (Maurer et al. 2004) nebo ionomycin, který budeme používat i v této práci. Ionomycin je ionofor, který umožňuje průchod vápenatých iontů do buňky. To způsobí aktivaci proteinkinázy C, což v konečném důsledku vede ke stimulaci a aktivaci buněk (Klemm et al. 2006).

### 2.1.5 Mediátory

Žírné buňky mají díky své lokalizaci spojení s krevními cévami, lymfatickými a epiteliálními povrchy a hladkými svaly. Není proto překvapivé, že jejich mediátory ovlivňují průtok, propustnost, sekreci a kontrakci v mnoha místech (Maurer et al. 2003). Efekt MC je určen množstvím a typem uvolněných mediátorů, jež mají rozdílné účinky a biologickou aktivitu. Soubor uvolněných mediátorů závisí na charakteru a rozsahu aktivačního stimulu.

Je třeba odlišit mediátory, které jsou již uloženy v granulích a mediátory, které jsou produkovány *de novo* po aktivaci. Mezi ty, které jsou v granulích již uloženy, patří biogenní aminy histamin a serotonin, jakož i proteoglykany heparin a chondroitinsulfát E, hydrolázy, oxidativní enzymy, chemotaktické faktory a také proteinázy jako jsou tryptáza, chymáza, dále karboxypeptidáza a katepsin G. Nově produkované lipidové mediátory jsou syntetizované z membránových fosfolipidů po aktivaci MC a zahrnují prostaglandin D2, leukotrien C4, v menší míře i leukotrien B4 a faktor aktivující destičky (Borish & Joseph 1992; Harvima et al. 1994).

MC po aktivaci produkují také řadu cytokinů a chemokinů. Především TNF- $\alpha$ , IL-1, 2, 3, 4, 5, 6 a také IL-10, 12, 13, 15 a IFN- $\gamma$ . Většina ze zmíněných cytokinů je zodpovědná za mnohé z patologických projevů při alergických reakcích (Galli et al. 1991; Burd et al. 1995; Harvima et al. 1994).

## 2.2 Klíště

Klíšťata jsou obligátní krev sající členovci. Mohou sát na širokém spektru různých hostitelů od obojživelníků, plazů, ptáků až po savce včetně člověka. Jsou významnými vektory a též rezervoáry různých patogenů. Podílí se tak na vzniku onemocnění, jež mohou vést až ke smrti napadeného živočicha (Anderson & Magnarelli 2008; Parola & Raoult

2001). Každý druh klíštěte upřednostňuje jiné optimální podmínky na životní prostředí a biotop. Rozmístění v různých stanovištích následně ovlivňuje výběr hostitele a tím je určeno geografické rozložení a také rizikové oblasti pro onemocnění přenášena klíšťaty. Různé druhy klíšťat vykazují různou afinitu k lidem jakožto hostitelům (Parola & Raoult 2001).

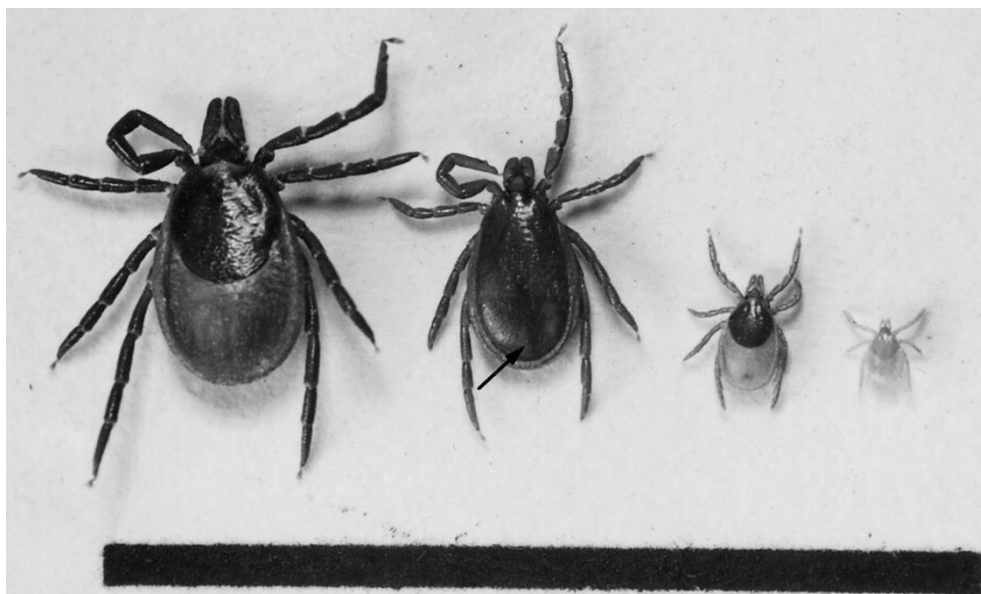
Odlišujeme dvě hlavní čeledi klíšťat. Početně velmi významná čeleď Ixodidae neboli „tvrdá klíšťata“, která je důležitá i z lékařského hlediska a čeleď Argasidae, jinak také „měkká klíšťata“. Další čeleď, Nuttalliellidae, má jen jednoho zástupce (Anderson & Magnarelli 2008). Měkká klíšťata sají rychle a opakovaně a pronikají hluboko do kůže hostitele, takže způsobují značná poškození (Binnington & Kemp 1980). Naproti tomu tvrdá klíšťata sají pouze jednou v každém vývojovém stádiu. Z toho důvodu je také doba sání mnohem delší. Pro účely této diplomové práce byla používána klíšťata druhu *Ixodes ricinus* neboli klíště obecné.

Než klíště začne sát, může se na hostiteli pohybovat i několik hodin. Poté vsune hypostom do kůže a během toho proniknou do hostitele různé látky vyprodukované slinnými žlázami. Rána se začne plnit krví a utvoří se tzv. „feeding pool“. Během prvních 24-36 hodin kdy je klíště upevněno na hostiteli, nedochází skoro k žádnému požití krve; převládající činností je penetrace a upevňování se na hostiteli. Slinné sekrety produkované klíšťaty čeledě Ixodidae obsahují takzvaný cement, který pomáhá ukotvit ústní ústrojí do kůže hostitele. Enzymy, vasodilatátory, protizánětlivé, anti-hemostatické a imunosupresivní látky, které se nachází ve slinách, pak pomáhají k úspěšnému sání a anestetika, která se v nich také nachází, pomáhají učinit kousnutí prakticky bezbolestným. Ve slinách se mohou nacházet i toxiny, jež mohou způsobit paralýzu hostitele (Parola & Raoult 2001; Sonenshine 1991).

Sání trvá obvykle 2-15 dní s rozdíly podle druhu klíštěte, typu hostitele a také místa připevnění klíštěte. Během „krmení“ se střídají fáze sání, slinění a regurgitace. Když je klíště nasáté, oddělí se od hostitele a najde si místo, kde může strávit krev a připravit se k dalšímu sání anebo může vstoupit do diapauzy, kdy se zpomalí metabolismus a vývoj se opoždí. Devadesát procent života tak stráví klíště nepřipojeno na hostitele. Doba, kdy klíště saje na hostiteli je v podstatě jen krátké mezidobí (Needham & Teel 1991).

Životní cyklus klíštěte trvá většinou dva až tři roky, nicméně podle podmínek prostředí může trvat od šesti měsíců do šesti let. Sestává ze tří stádií, která zahrnují larvu,

nymfu a dospělé, tedy samičku a samečka (obrázek 2). Mezi každým stádiem se klíště nasaje vždy jen jednou. Obecně platí, že samečci klíšťat sají jen velmi krátce, anebo vůbec (Parola & Raoult 2001). Páření probíhá na hostiteli a po tom, co se samička od hostitele odpojí, aby mohla trávit, klade vajíčka. Jejich počet se pohybuje mezi 400-20 000, podle druhu klíštěte. Po naklazení vajíček klíště hyne (Sonenshine 1991).



**Obrázek 2:** Vývojová stádia klíštěte *Ixodes ricinus* (Zleva samička, sameček, nymfa a larva; měřítko 1 cm), (Parola & Raoult 2001).

Přisáté klíště by mělo být odstraněno co nejdříve a kontakt s klíštětem by se měl pokud možno minimalizovat. Klíště může navíc pokračovat ve slinění i po odstranění, proto není vhodné na ně sahat holými prsty, aby nedošlo k přenosu infekce přes oděrky (Needham 1985).

Klíšťata mohou způsobovat paralýzu, toxikózu, podráždění či alergické reakce a jsou přenašeči širokého spektra virových, bakteriálních a protozoálních patogenů. Jako vektory lidských bakteriálních onemocnění jsou popisována již od počátku dvacátého století. Hlavní podíl na tom měl objev etiologického agens Lymeské boreliózy, *Borrelia burgdorferi*, v roce 1982 (Burgdorfer et al. 1982; Parola & Raoult 2001). Přenos patogenů je zprostředkován pomocí kontaminovaných slinných sekretů, při regurgitaci obsahem střev či výkaly. Jsou známy i nepřímé cesty přenosu, například oděrkami kůže či přes oči (Parola & Raoult 2001).

Dnes jsou klíšťata uváděna po komárech jako druhí nejčastější přenašeči infekcí. Onemocnění přenášená klíšťaty jsou nejrozšířenější a v Evropě převažují mezi všemi

lékařsky významnými onemocněními přenášenými vektory (Randolph 2010). *Ixodes ricinus* je v Evropě hlavním vektorem několika patogenů, které způsobují onemocnění zvířat i lidí. Jedná se hlavně o Lymfskou boreliózu, klíšťovou encefalitidu, ehrlichiózu a babeziózu (Mysterud et al. 2015).

### 2.2.1 Klíštěcí sliny

Sliny klíšťat sestávají z velké většiny z vody a iontů a obsahují bioaktivní látky, které mají zásadní význam a u různých druhů se liší. Pomáhají klíštěti obcházet či narušovat imunitní reakce hostitele a umožňují tak dokončit sání klíštěte. Předpokládá se, že každý protein ve slinách má víceméně specifickou funkci. V současné době je identifikováno a částečně charakterizováno několik desítek různých slinných proteinů klíšťat. Přesto stále čeká spousta dalších na svou charakterizaci.

Běžnou reakcí hostitele na poškození kůže a přítomnost sajícího klíštěte je tvorba „hemostatické zátky“, aktivace koagulační kaskády, vazokonstrikce a zánětlivá reakce vedoucí k hojení rány a remodelaci tkáně. Všechny tyto procesy mají za úkol přerušit sání klíštěte a způsobit jeho odpadnutí (Bowman et al. 1997). Klíště si však vyvinulo mechanismy, kterými se snaží hemostázu narušit. Mezi antikoagulační látky, které se ve slinách nacházejí, patří inhibitory faktoru X nebo trombinu, protože v tomto bodě se setkávají obě aktivační cesty koagulační kaskády – vnější a vnitřní (Vlasuk 1993; Iwanaga et al. 2003). Ve slinách klíštěte *Ixodes dammini* můžeme najít enzym zvaný apyráza, který blokuje agregaci destiček přes hydrolýzu ATP a ADP na AMP a orthofosfát. Zabraňuje také agregaci neutrofilů a degranulaci MC (Ribeiro et al. 1985).

U některých druhů jsou ve zvláště vysoké koncentraci prostaglandiny. Je jich tam dokonce mnohem více, než v zánětlivém exsudátu savců. Příkladem je prostaglandin E<sub>2</sub> který má anti-hemostatické a vazodilatační účinky, inhibuje agregaci destiček (Bowman et al. 1997; Ribeiro et al. 1985), potlačuje produkci IFN- $\gamma$  a IL-2 a také inhibuje expresi receptoru pro IL-2, která je závislá na produkci IL-2 (Betz & Fox 1991; Tilden & Balch 1982; Krause & Deutsch 1991). PGE<sub>2</sub> dále moduluje produkci cytokinů dendritickými buňkami a produkci LTB<sub>4</sub> neutrofilů (Ham et al. 1983; Oliveira et al. 2011). Prostacyklin, který ve slinách také najdeme, způsobuje stejně jako PGE<sub>2</sub> vazodilataci a blokuje agregaci destiček a navíc inhibuje degranulaci MC (Ribeiro et al. 1988). Sliny některých klíšťat

vykazují mimo jiné i anti-komplementovou aktivitu. Bylo prokázáno, že v jejich přítomnosti došlo k narušení alternativní dráhy aktivace komplementu. Tyto účinky jsou připisovány proteinu Salp20, jež byl izolován ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* (Ribeiro 1987; Hourcade et al. 2016). V klíštěcích slinách některých druhů byly také objeveny proteiny vázající imunoglobulin-G (Wang & Nuttall 1995) a proteiny vázající histamin (Paesen et al. 1999). Sliny také podporují infekci patogeny, jež členovec přenáší právě díky tomu, že modulují imunitní reakci hostitele a tím usnadňují patogenům infikovat hostitele (Hajnická et al. 1998).

Vlivem klíštěcích slin byla v několika studiích pozorována u různých buněk snížená produkce TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  a IL-1, 2, 4, 6 a 10 (Pechová et al. 2004; Preston et al. 2013; Ramachandra & Wikel 1992, 1995). Jednalo se o myší dendritické buňky, makrofágy, lymfocyty a epidermální buňky. V myších splenocytech byla vlivem slin pozorována silná up-regulace tří chemokinů. MCP-1, neboli monocytární chemotaktický protein 1, TCA-3, neboli chemotaktické agens odvozené od thymu a MIP-2, makrofágový zánětlivý protein 2 (Langhansová et al. 2015). Zatímco většina makrofágových a Th<sub>1</sub> prozánětlivých cytokinů je down-regulována, produkce Th<sub>2</sub> cytokinů, které jsou z většiny protizánětlivé, se vlivem slin zvyšuje (Schoeler et al. 1999). Mezi další imunomodulační proteiny s protizánětlivou funkcí, jež si klíště vyvinulo, řadíme tzv. evasiny. Jsou to vysoce selektivní proteiny, jež váží chemokiny (Déruaz et al. 2008).

Sliny klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* vykazují imunomodulační účinky na dendritické buňky na úrovni jejich diferenciaci, produkce cytokinů a též exprese kostimulačních molekul. Kromě TNF- $\alpha$  sliny zmíněného klíštěte inhibují IL-12p40 a naopak podporují produkci IL-10 dendritickými buňkami (Oliveira et al. 2011). Vlivem klíštěcích slin dochází také k ovlivnění T-buněk, NK buněk, neutrofilů a makrofágů (Kubes et al. 1994; Ribeiro et al. 1990; Ramachandra & Wikel 1995).

Expresce jednotlivých proteinů obsažených ve slinách se může během sání měnit. Poslední dny sání klíště exprimuje ve svých slinách jiné proteiny, než první den sání a může se tak vyhnout imunitní reakci hostitele (Francischetti et al. 2009). Je předmětem zkoumání, zda látky, obsažené ve slinách, nemohou být využity pro své farmakologické vlastnosti při léčbě hemostatických poruch, nádorů či autoimunitních poruch.



### 2.2.2 Vliv klíštěcích slin na žírné buňky

Žírné buňky soustředěné pod epitelialním povrchem kůže hrají důležitou roli při napadení krev-sajícími členovci včetně klíšťat. Vzhledem k tomu, že klíště může na hostiteli sát i více než deset dní, je proto pro klíště důležité být schopné dokončit sání, k čemuž je nutná aktivní modulace imunitní reakce.

Při testování vlivu slin klíštěte *Ixodes ricinus* na žírné buňky derivované z kostní dřeně myši bylo zjištěno, že dochází k ovlivnění produkce některých cytokinů. Nejvýrazněji byla snížena produkce IL-9, IL-4 a IL-13. Hladiny IL-6 byly sníženy jen málo a produkce TNF- $\alpha$  nebyla po 4 hodinách inkubace s klíštěcími slinami ovlivněna. Sliny také neměly žádný přímý dopad na stupeň degranulace buněk (Langhansová et al. 2012).

Důležitou funkcí MC je produkce histaminu. Předpokládá se, že histamin hraje roli při odmítnutí klíštěte hostitelem. Není proto divu, že si klíšťata vyvinula proteiny, jež histamin váží. Histamin vázající proteiny (HBPs) pravděpodobně přispívají k potlačení zánětu během sání klíštěte, jelikož jsou schopné soutěžit s histaminovými receptory a připravují je tak o jejich ligand. Tím narušují průběh hostitelské imunitní reakce a klíště může úspěšně sát (Paesen et al. 1999). Nicméně nedávno byl u několika druhů klíšťat identifikován faktor uvolňující histamin (HRF) (Mulenga & Azad 2005). Uvolněný histamin pak zajišťuje dostatečný přísun krve do místa sání. Tento překvapivý fakt byl vysvětlen tím, že klíště oba faktory, HRF a HBP, exprimuje v různých fázích sání podle toho, zda je nutné snížit či zvýšit průtok krve místem sání (Dai et al. 2010). Mimo zmíněné účinky způsobuje histamin svědění v místě připojení klíštěte a může tak vést k tomu, že hostitel si jej škrábáním sám odstraní.

V reakci na sání klíštěte se do místa poškození dostává mnoho protilátek, které začne produkovat hostitel. Homocytotropické imunoglobuliny se následně vážou na Fc receptory na MC a bazofilech a způsobí tak jejich degranulaci a uvolnění mediátorů. V několika studiích bylo pozorováno zvýšené množství degranulovaných žírných buněk v místě rány při sekundární infestaci oproti primárnímu sání (Brossard & Fivaz 1982; Ushio et al. 1993). Z toho vyplývá, že MC jsou také schopné specificky rozpoznávat klíštěcí antigeny a při opakovaném sání rychleji reagovat, kdy degranulace je tak silnější z důvodu předchozí senzibilizace MC homocytotropickými IgE (Brossard & Fivaz 1982). Naproti tomu se objevují zmínky o tom, že klíšťata dokáží degranulaci částečně zabránit. Protože sliny některých klíšťat obsahují apyrázu, enzym, hydrolyzující ATP, jež je potřebné

pro degranulaci MC, mohou tak tento proces částečně potlačovat (Cockcroft & Gomperts 1979; Ribeiro et al. 1985).

## **2.3 Vybrané signální molekuly a jejich funkce**

Signální kaskády v buňkách jsou složeny z mnoha molekul, které na sebe navzájem navazují a přenášejí signál na další molekuly, čímž dochází nejen k zesílení, ale také k modulaci signálu. Fosforylace a proteolýza jsou rozšířené post-translační modifikace, které v biologii fungují jako důležitý regulační mechanismus. Detekce těchto úprav na dobře prozkoumaných buněčných proteinech tak může poskytnout široký pohled do intracelulárních signalizací, jelikož jejich role je velmi důležitá ve všech aspektech buněčných funkcí.

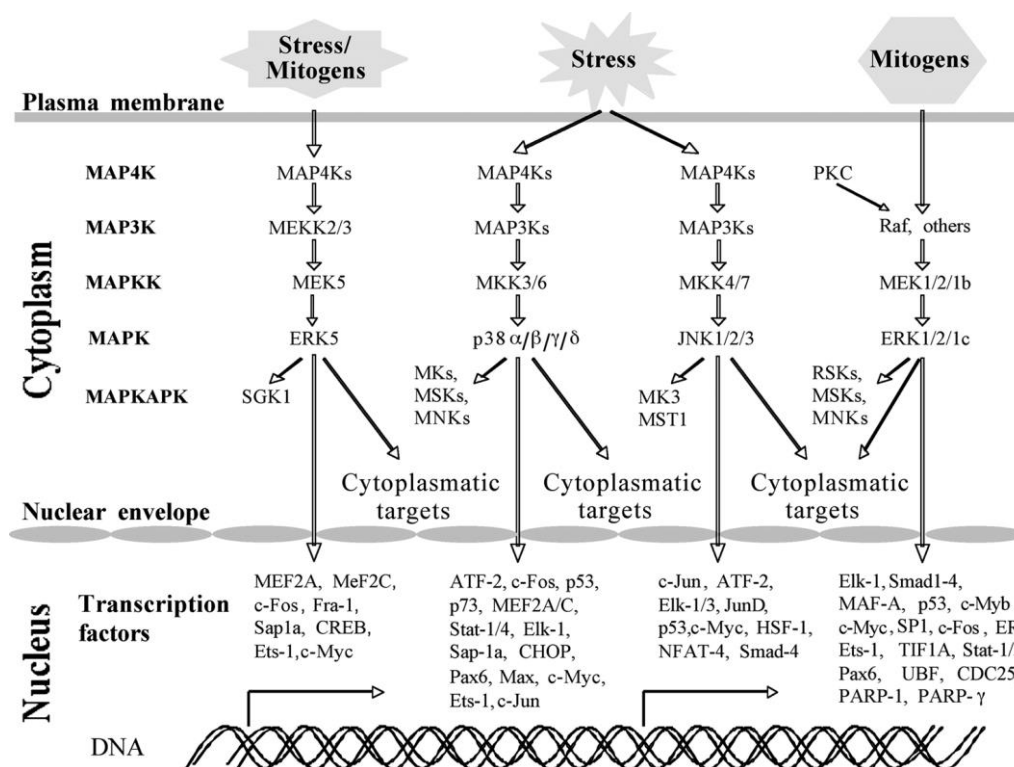
### **2.3.1 ERK1/2 MAP kináza**

První z několika signálních molekul, kterými se tato práce zabývá, je ERK1/2 MAP kináza. MAPK/ERK kaskáda je jedna z nejlépe charakterizovaných a široce sledovaných signálních drah. Je zapojena do širokého spektra buněčných procesů a je aktivována širokým spektrem extracelulárních signálů.

ERK1/2 kináza patří do rodiny savčích MAP kináz, které se účastní přenosu extracelulárních signálů do buňky (Boulton et al. 1990). Savčí MAP kinázy (proteinkinázy aktivované mitogenem) tvoří cytoplazmatické proteinové serin/threonin kinázy a patří sem kromě extracelulárně regulovaných kináz (ERK) také rodina p38 kináz a rodina JNK kináz neboli SAPK (stresem aktivované proteinkinázy). Každá signalizační dráha MAPK sestává z kaskády alespoň tří proteinkináz, MAPKKK (nebo MAP3K), MAPKK (nebo MAP2K) a MAPK (Waskiewicz & Cooper 1995; Dhillon et al. 2007). Zde je MAPKK kinázou MEK 1/2, která katalyzuje fosforylaci lidské ERK 1/2 na Tyr204/187 a pak na Thr202/185. Defosforylace ERK1/2 kinázy je zprostředkována fosfatázami, což činí celý proces vratným a pomáhá ho regulovat (Roskoski 2012).

ERK1/2 se účastní tzv. Ras-Raf-MEK-ERK signální kaskády. Tato kaskáda se podílí na regulaci široké škály procesů zahrnující adhezi buněk, vývojový cyklus, přežívání, migraci, diferenciaci, také metabolismus, proliferaci a transkripci. U nádorových

onemocnění se často objevují mutace v genech celé této kaskády, což vede k její up-regulaci (Roskoski 2012). Nicméně signalizační kaskáda Ras-Raf-MEK-ERK bývá narušená také při dalších onemocněních, jako jsou diabetes, poruchy mozku, srdeční hypertrofie či zánět (shrnuto v Tanti & Jager 2009; Montagut & Settleman 2009; Chico et al. 2009; Muslin 2008).



**Obrázek 3:** Schematické znázornění MAPK kaskád a jejich jaderných cílů (převzato z Plotnikov et al. 2011).

Tyto kinázy jsou aktivovány mitogenními a jinými stimuly v celé řadě buněk. Studie prokázaly jejich aktivaci po stimulaci bradykininem, epidermálním růstovým faktorem, fibroblastovým růstovým faktorem, insulinem, insulin-like růstovým faktorem 1, nervovým růstovým faktorem a růstovým faktorem derivovaným z krevních destiček. Dalšími možnostmi aktivace jsou cytokiny, osmotický stres či receptory spřažené s G-proteinem (shrnuto v Cobb et al. 1991; Raman et al. 2007). V případě žírných buněk dochází k aktivaci MAPK dráhy stimulací buňky prostřednictvím přemostění Fc<sub>ε</sub>RI receptoru komplexem IgE-Ag. Ve funkcích žírných buněk jsou předpokládány důležité role těchto drah právě ve schopnosti ERK 1/2, JNK a p38 regulovat transkripční aktivitu různých genů, zvláště pak cytokinových genů (Ishizuka et al. 1998, 1999; Garrington et al. 2000).

Lidské ERK 1 a 2 mají prakticky identickou sekvenci a mají společnou většinu funkcí, substrátů i aktivátorů (Gonzalez et al. 1991; Garcia et al. 2002; Boulton et al. 1991), z toho důvodu se uvádí jako ERK1/2. Buněčná stimulace dráhy ERK1/2 vede k paralelní aktivaci obou enzymů, ERK1 i ERK2 (Lefloch et al. 2008). Stejně jako většina kináz i ERK1/2 obsahují unikátní C- a N-terminální úsek, který poskytuje signální specifitu. Další funkční specifitu poskytuje 31-aminokyselinový zbytek vložený mezi kinázovými doménami (Roskoski 2012).

Cytoplazmatických substrátů ERK1/2 bylo identifikováno více než padesát. Řadíme sem fosfatázy, rodinu RSK proteinkináz, cAMP fosfodiesterázy (PDE4), cytosolovou fosfolipázu A2, cytoskeletální proteiny, apoptotické proteiny a jiné signální a regulační molekuly (Roskoski 2012; Lin et al. 1993; Zúñiga et al. 1999; Yoon & Seger 2006). Jaderné cíle pro ERK1/2 zahrnují rodinu transkripčních faktorů TCF, včetně Elk-1 a Sap-1 (Price et al. 1996; Janknecht et al. 1993). ERK1/2 kaskáda dále reguluje remodelaci chromatinu (Brami-Cherrier et al. 2009). RSK, neboli rodina ribozomálních S6 kináz, je skupina proteinových serin/threonin kináz, které jsou aktivovány pomocí ERK a p38 kináz (Frödin & Gammeltoft 1999). ERK1/2 a RSK1/2 po přesunu do jádra fosforylují další transkripční regulátory jako CREB, histon H3, Ets a STAT. To má za následek rychlou indukci IEGs (z angl. immediate early genes). Prostřednictvím produktů IEG dochází k regulaci přežívání, dělení a dalších buněčných pochodů (Brami-Cherrier et al. 2009; Sharrocks 2001; Murphy & Blenis 2006).

Existují data, která naznačují, že klíštěcí sliny výrazně ovlivňují signální dráhu ERK1/2 MAP kinázy. Ve studii (Oliveira et al. 2010) došlo vlivem klíštěcích slin k modulaci produkce pro-zánětlivých cytokinů dendritickými buňkami stimulovanými lipopolysacharidem. Tento imunomodulační efekt byl spojován se skutečností, že klíštěcí sliny inhibují signální dráhy ERK a p38 MAP kináz. Inhibice zmíněných signálních drah pravděpodobně způsobila i narušení maturace myších DC, kdy sliny výrazně inhibovaly fosforylaci obou kináz po jejich předchozí aktivaci pomocí LPS. Ve studii (Kramer et al. 2008) došlo ve fibroblastech vlivem klíštěcích slin ke snížení aktivity ERK kinázy stimulované růstovým faktorem z destiček (PDGF). Data z této studie naznačují, že klíštěcí sliny mohou potlačovat hostitelské mechanismy hojení rány tím, že narušují motilitu buněk zapojených do těchto mechanismů právě inhibicí signální dráhy ERK, která má na motilitu buněk klíčový vliv.

### 2.3.2 p38 MAP kináza

Další z rodiny MAP kináz je p38 MAP kináza. Poprvé byla tato molekula izolována jako protein o velikosti 38 kDa, který byl v různých buňkách silně fosforylován vlivem LPS (Han et al. 1993, 1994). Obrázek 3 znázorňuje modul p38, který se skládá z několika MAPKKK, z MAPKK (MEK3 a 6, případně MEK4) a ze čtyř izoform p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ). Všechny izoformy p38 se vyznačují tzv. TGY motivem, což je specifická Thr-Gly-Tyr sekvence aminokyselin, na které probíhá fosforylace (Ono & Han 2000). Homology p38 byly identifikovány a klonovány u nižších i vyšších eukaryotických druhů, včetně much, žab a kvasinek (Han et al. 1993; Brewster et al. 1993; Shiozaki & Russel 1995).

K aktivaci p38 dochází při reakci na fyzický či chemický stres buňky, jako je oxidativní či osmotický stres, UV záření, hypoxie, ischemie a různé cytokiny, jako jsou IL-1 nebo TNF- $\alpha$  (Han et al. 1994; Lee et al. 1994; Raingeaud et al. 1995; Plotnikov et al. 2011). MEK 3 a 6 se vyznačují vysokou specifitou pro p38, neaktivují ERK1/2 ani JNK. Naopak MEK4 může aktivovat i p38 (Brancho et al. 2003). Zatímco MEK6 aktivuje veškeré izoformy p38, MEK3 je poněkud selektivní a přednostně fosforyluje izoformy p38 $\alpha$  a  $\beta$ . Aktivace následuje po MEK3/6-katalyzované fosforylaci konzervovaného motivu TGY v aktivační smyčce (Lee et al. 1994; Enslen et al. 2000). Ve studii (Kamide et al. 2015) došlo ke stimulaci aktivace p38 MAPK a proteinkinázy B (Akt) v žírných buňkách vlivem kyselého pH.

Zdá se, že aktivace dráhy p38 je důležitá pro imunitní a zánětlivé reakce. Aktivace této dráhy hraje roli v produkci prozánětlivých cytokinů, v expresi intracelulárních enzymů regulujících oxidaci, v indukci adherentních proteinů a také v proliferaci a diferenciaci buněk imunitního systému, kdy se účastní GM-CSF, CSF, erythropoetinem a CD40-indukované proliferace a diferenciaci buněk (Ono & Han 2000; Pietersma et al. 1997; Badger et al. 1998; Craxton et al. 1998). V žírných buňkách byla prokázána silná závislost produkce prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IL-6 indukovaná pomocí LPS na aktivaci p38 (Hochdörfer et al. 2013).

Přítomnost p38 byla zaznamenána v jádře i v cytoplasmě buněk v klidovém stavu. Po aktivaci se p38 přesouvá do jádra buňky, kde může dále vykonávat své funkce (Raingeaud et al. 1995; Ben-Levy et al. 1998). K těm patří fosforylace některých transkripčních faktorů, jako například ATF2, NF- $\kappa$ B, Sap-1, Elk-1, Ets-1 a p53. Další cíle pro p38 představuje Tau protein asociovaný s mikrotubuly či některé další kinázy

(Raingeaud et al. 1995; Roux & Blenis 2004; Price et al. 1996; Janknecht & Hunter 1997). Uvádí se, že substrátová specifita p38 je podobná substrátové specifitě ERK kinázy. Stejnými cíli pro obě kinázy jsou například MBP (myelinový bazický protein) a EGF-R (receptor epidermálního růstového faktoru). Naopak cytosolovou fosfolipázu A2 (cPLA<sub>2</sub>) p38 nefosforilyje (Raingeaud et al. 1995).

Ve studii (Oliveira et al. 2010) byl sledován vliv klíštěcích slin na dendritické buňky (DC). Imunomodulační účinek klíštěcích slin na produkci pro-zánětlivých cytokinů DC stimulovaných LPS byl spojován se zjištěním, že klíštěcí sliny inhibují aktivaci ERK1/2 a p38 kináz. Kromě toho, DC ošetřené klíštěcími slinami vykazovaly podobné vzory modulace cytokinů v reakci na jiné TLR ligandy. Data dále naznačují, že klíštěcí sliny indukují regulační DCs, které produkují IL-10 a nízké hladiny IL-12 a TNF- $\alpha$  po stimulaci ligandy TLR. Regulační DCs jsou spojovány s inhibicí ERK a p38 drah, které podporují produkci IL-10 a tudíž oslabují hostitelskou imunitní reakci.

Existují také důkazy naznačující korelaci mezi aktivací dráhy p38 a apoptózou. Fetální neurony potřebují inzulin pro přežívání a diferenciaci. Ve studii (Heidenreich & Kummer 1996) došlo u neuronů ošetřených insulinem k výraznému poklesu aktivity p38 MAP kinázy, ale v případě dalších MAPK k ovlivnění nedošlo. V další studii došlo k výraznému nárůstu aktivity p38 po odstranění séra z buněčných kultur krysích fibroblastových buněk. Po přidání insulinu do stejné kultury došlo k výraznému potlačení aktivity p38, přičemž podobných výsledků bylo dosaženo i v non-neurálních buňkách (Kummer et al. 1997). Je proto možné usuzovat, že inzulin, který je potřebný pro přežití buněk, inhibuje apoptotickou dráhu zprostředkovanou p38. Jelikož proteinovým cílem p38 je rodina apoptotických proteinů Bcl-2, indukce apoptózy zmíněnou kinázou může probíhat právě prostřednictvím fosforylace členů Bcl-2 rodiny (v tomto případě BIM<sub>EL</sub>). Studie (Cai et al. 2006) to prokázala při pokusech na PC12 buňkách.

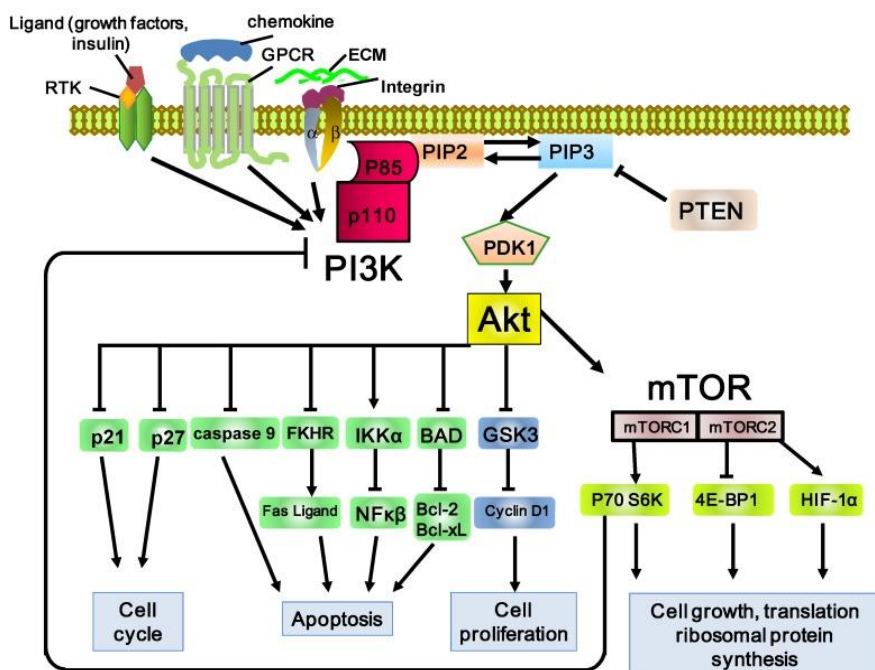
### 2.3.3 Akt (PI3K/Akt)

Akt, nebo též proteinkináza B (PKB), se skládá ze tří blízce a evolučně příbuzných izoform, Akt1/2/3, nebo též PKB $\alpha/\beta/\gamma$ , které mají vysoce konzervovanou doménovou strukturu zahrnující N-terminální PH (pleckstrin homologní) doménu, kinázovou doménu a regulační C-konec obsahující hydrofobní motiv. K úplné aktivaci Akt je potřebná

fosforylace na dvou místech a to v oblasti kinázové domény (Thr308) a na C-terminálním konci (Ser473) (Alessi et al. 1996). Akt1 je široce distribuována ve tkáních a je zapojena do růstu a přežívání buněk. Akt1<sup>-/-</sup> myši vykazovaly chyby ve fetálním a post-fetálním růstu přetrvávající až do dospělosti (Chen et al. 2001; Cho et al. 2001a). Akt2 je vysoce exprimována ve svalech a adipocytech a přispívá k regulaci glukózové homeostázy zprostředkované insulinem (Cho et al. 2001b; Garofalo et al. 2003). Distribuce Akt3 je poněkud omezenější a exprese je poměrně nízká, najdeme ji tak převážně v mozku či varlatech (Nakatani et al. 1999; Garofalo et al. 2003). Bylo prokázáno, že Akt je klíčovou molekulou v progresi rakoviny (Hill & Hemmings 2002).

Za normálních okolností je Akt udržována v neaktivním stavu pomocí intramolekulárních interakcí mezi PH a kinázovými doménami (Calleja et al. 2007). Fosforylace Akt na Thr308 zvyšuje její aktivitu asi stokrát, nicméně maximální aktivita Akt vyžaduje další fosforylaci a to v hydrofobním motivu na Ser473. Obě místa mohou být fosforylována nezávisle na sobě (Alessi et al. 1996). Po fosforylaci a aktivaci Akt disociuje od membrány a přesouvá se do cytosolu a jádra, kde aktivuje downstreamové signální dráhy tím, že fosforyluje velké množství substrátu. Akt signalizace je ukončena defosforylací Thr308 a Ser473 působením fosfatáz PP2 (z angl. protein phosphatase 2) a PHLPP (z angl. PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase) (Andjelković et al. 1996; Alessi et al. 1996).

Akt je jedna z klíčových molekul aktivovaných v rámci signální dráhy PI3K (fosfatidylinositol-3 kináza). Mnoho růstových faktorů a cytokinů stimuluje zvýšení aktivity PI3 kinázy, vedoucí v následné zvýšení PI(3,4)P<sub>2</sub> a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> v buňkách. Tyto fosfoinositoidy tvoří vazebné místo pro PH doménu obsahující proteiny jako jsou Akt a PDK1 (z angl. phosphoinositide dependent protein kinase), a tím je pomáhá transportovat k membráně (Hers et al. 2011). Signální dráhy řízené PI3K v různé míře regulují receptorem zprostředkovaný růst, diferenciaci, přežití a aktivaci a také navádění do cílových tkání.



**Obrázek 4:** Schematické znázornění signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (převzato z Matsuoka & Yashiro 2014).

Akt reguluje mnoho buněčných procesů. Zapojuje se do metabolismu, proliferace, přežívání a růstu buňky a také do procesu angiogeneze. Tyto funkce zprostředkovává díky Ser/Thr fosforylaci navazujících substrátů. Mnohé z těchto substrátů mají víc než jednu funkci a jeden proces je často zprostředkován několika navazujícími cílovými molekulami. Fosforylace pomocí Akt může mít na proteinové substráty mnoho účinků včetně inhibice či stimulace jejich aktivity, ovlivnění jejich sub-celulární lokalizace, může poskytovat ochranu před degradací nebo regulační vazbou na proteinové vzory (Alessi et al. 1996; Hers et al. 2011).

Významnou funkcí této signalizační dráhy je podpora růstu buněk a syntézy proteinů přes regulaci signální dráhy mTOR. PI3K a Akt mohou regulovat mTOR prostřednictvím tumorsupresorových genů TSC1 a 2 (z angl. tuberous sclerosis protein). Ty spolu tvoří funkční komplexy a poté inhibují p70 S6K, což je aktivátor translace, a naopak aktivují 4E-BP1, což je inhibitor translace. Tyto funkce jsou zprostředkovány inhibicí mTOR, což v konečném důsledku vede k narušení buněčného růstu. Ve studii (Inoki et al. 2002) bylo prokázáno, že Akt fosforyluje TSC2, což vede k jeho destabilizaci a narušení interakce s TSC1 a následně inhibuje jejich fyziologickou funkci.



Důležitým cílem pro Akt je GSK-3 (z angl. glykogen synthase kinase-3). GSK-3 se zapojuje do regulace některých fyziologických procesů, včetně řízení syntézy glykogenu a proteinů, modulace transkripčních faktorů AP-1 a CREB apod. GSK-3 je vlivem insulinu nebo růstových faktorů fosforylována a tím inhibována. Inhibice GSK-3 pomocí Akt tedy umožňuje syntézu glykogenu, což má pozitivní vliv na přežívání buněk (Cross et al. 1995). Na pozitivní regulaci přežívání buněk se také podílí schopnost Akt fosforylovat ASK1 (z angl. apoptosis signal related kinase), která vede k prevenci apoptózy (Kim et al. 2001). V neposlední řadě Akt podporuje přežívání buněk prostřednictvím negativní regulace některých proapoptotických proteinů Bcl-2, například Bad (Datta et al. 1997, 2002)

Předpokládá se, že transdukční signální cesta PI3K/Akt inhibuje signály způsobující produkci některých zánětlivých cytokinů. Ve studii (Fukao et al. 2002) došlo k negativnímu ovlivnění produkce IL-12 dendritickými buňkami prostřednictvím aktivace PI3K dráhy. Dále bylo zjištěno, že Akt reguluje produkci a sekreci IL-2 a TNF- $\alpha$  v žírných buňkách stimulovaných Fc $\epsilon$ RI a to pomocí transkripční aktivace NF- $\kappa$ B, NF-AT, a AP-1, které přispívají k produkci cytokinů (Kitaura et al. 2000).

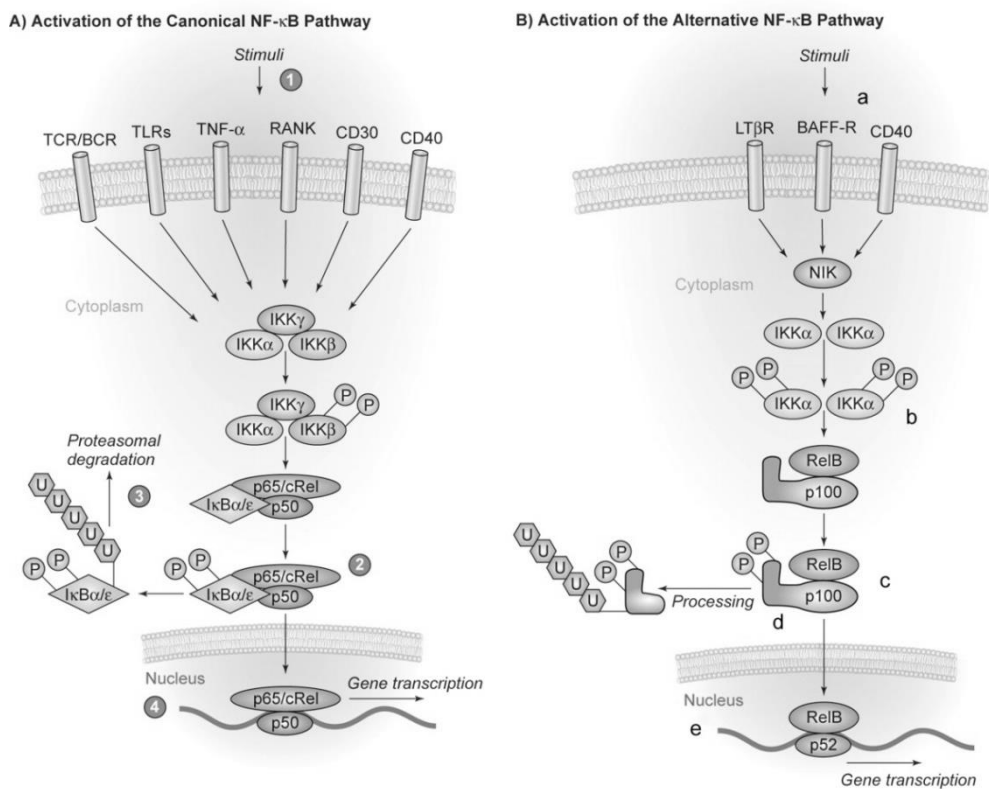
Klíštěcí sliny ovlivňují také PI3K/Akt signální dráhu. Ve studii (Lieskovská & Kopecký 2012) byl pozorován inhibiční efekt slin na fosforylaci Akt v dendritických buňkách. Signální dráha PI3K/Akt spolu s NF- $\kappa$ B a MAPK signálními drahami zde byla aktivována pomocí spirochét rodu *Borrelia*. Klíštěcí sliny potlačovaly aktivaci NF- $\kappa$ B a ERK1/2. Aktivace Akt byla také ovlivněna, ale do menší míry (Lieskovská & Kopecký 2012). V buňkách Saos-2 (buněčná linie z osteosarkomu) aktivovaných EGF došlo vlivem klíštěcích slin také k potlačení aktivace Akt kinázy (Poole et al. 2013).

#### **2.3.4 NF- $\kappa$ B**

Poslední signální molekulou, na kterou se tato práce zaměřuje, je skupina transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B. Jedná se o velkou rodinu proteinů skládající se ze dvou podrodin: NF- $\kappa$ B proteinů a Rel proteinů. NF- $\kappa$ B/Rel proteiny zahrnují NF- $\kappa$ B2 p100/p52, NF- $\kappa$ B1 p105/p50, RelA/p65, RelB a c-Rel (Bonizzi & Karin 2004). Všechny spolu sdílejí tzv. RHD doménu (z angl. Rel homology domain), což je vysoce konzervovaná DNA vázající doména. Pomocí této domény mohou tvořit dimery, které se vážou na cílové DNA sekvence zvané  $\kappa$ B místa. Tím dochází k modulaci genové exprese. RelA, c-rel a RelB

také obsahují C-terminální trans-aktivační doménu (TAD), která umožňuje aktivovat expresi cílového genu. p50 a p52 naproti tomu tuto doménu neobsahují, proto jejich dimery transkripci potlačují, pokud však nejsou vázány na protein obsahující TAD. p50 a p52 často tvoří heterodimery s RelA, c-rel nebo RelB a chovají se pak jako transkripční aktivující dimery (shrnuje v Hayden et al. 2006).

NF- $\kappa$ B se nachází prakticky ve všech typech buněk a podílí se na aktivaci mimořádně velkého počtu genů v reakci na infekci, zánět a jiné stresové situace vyžadující okamžité přeprogramování genové exprese. Ve většině buněk nalezneme inaktivní komplexy NF- $\kappa$ B hlavně v cytoplazmě v komplexu s některým z inhibičních proteinů z rodiny I $\kappa$ B, které zadržují dimery NF- $\kappa$ B v cytoplazmě. Když dojde k aktivaci dráhy, inhibiční protein je degradován a komplex NF- $\kappa$ B vstupuje do jádra, kde dále uskutečňuje své funkce (Hayden et al. 2006; Arenzana-Seisdedos et al. 1997).



**Obrázek 5:** Aktivace kanonické a alternativní NF- $\kappa$ B signální dráhy (převzato z Jost & Ruland 2007).

Existují dvě základní cesty aktivace NF- $\kappa$ B. Klasická neboli „kanonická“ dráha, je vyvolána mikrobiálními produkty a prozánětlivými cytokiny jako jsou TNF- $\alpha$  a IL-1. To obvykle vede k aktivaci komplexů obsahujících RelA nebo c-Rel (Lawrence 2009).

Alternativní cesta je aktivována většinou členů rodiny TNF cytokinů; lymfotoxinem  $\beta$  (Dejardin et al. 2002), ligandem CD40 (CD40L), aktivačním faktorem B buněk (BAFF) (Bonizzi & Karin 2004), a ligandem aktivátoru receptoru NF- $\kappa$ B (RANKL) (Novack et al. 2003), ale ne TNF- $\alpha$ . Její navázání na receptor vede k aktivaci komplexů RelB/p52 (Lawrence 2009). Obě cesty jsou charakterizovány odlišnou potřebou IKK podjednotek. Komplex IKK (I $\kappa$ B kináza) sestává z dvou podjednotek, IKK $\alpha$  (IKK1) a IKK $\beta$  (IKK2) a regulační podjednotky IKK $\gamma$ . IKK $\beta$  reguluje aktivaci kanonické cesty prostřednictvím fosforylace I $\kappa$ Bs a vyžaduje podjednotku IKK $\gamma$ , ale ne IKK $\alpha$ . Alternativní cesta je naopak na podjednotce IKK $\alpha$  závislá a po aktivaci vede k translokaci p52/RelA dimerů do jádra (Lawrence 2009; Bonizzi & Karin 2004; Senftleben et al. 2001a; Zandi et al. 1997). Mnoho odlišných signálních drah, které aktivují NF- $\kappa$ B se sbíhá v bodě I $\kappa$ B kináz, které jsou pro přenos signálu nezbytné.

Uvádí se, že signální dráhy NF- $\kappa$ B mají důležitou úlohu v regulaci imunitního systému. Klasická signální dráha NF- $\kappa$ B založená na degradaci I $\kappa$ B závislé na IKK $\beta$  je zásadní pro reakce vrozené imunity. Například deficit RelA a IKK $\beta$  vede ke zvýšení náchylnosti k infekcím, pokud se ovšem předejde embryonální letalitě, která je s těmito deficiencemi také spojená (Alcamo et al. 2001; Senftleben et al. 2001b). Aktivace a translokace NF- $\kappa$ B dimerů (hlavně p50/RelA) do jádra je spojena se zvýšenou transkripcí genů kódujících chemokiny, cytokiny, adhezivní molekuly (ICAM-1, VCAM-1, ELAM), enzymy podporujících produkci sekundárních zánětlivých mediátorů a inhibitory apoptózy (shrnutí v Bonizzi & Karin 2004).

Stimulace TLR4, který je receptorem pro LPS, na povrchu MC a makrofágů vede k produkci cytokinů závislé na NF- $\kappa$ B; jedná se hlavně o TNF- $\alpha$  a IL-6. Kromě NF- $\kappa$ B může signalizace přes TLR4 také stimulovat dráhy MAP kináz vedoucí k aktivaci ERK a p38 (Shimura et al. 2012; Zuckerman et al. 1991; Zorn et al. 2009).

Klíštěcí sliny zasahují do několika signálních drah, které se mohou podílet na mnoha z inhibičních vlivů dendritických buněk. Například sliny klíštěte *I. ricinus* inhibují NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt a ERK1/2 signální dráhy v dendritických buňkách po jejich aktivaci prostřednictvím ligandu TLR2 (Lieskovská & Kopecký 2012). Složky slin klíštěte *I. scapularis* také narušují funkci NF- $\kappa$ B. Bylo zjištěno, že protein Salp15, který je v nich obsažen, narušuje fosforylaci kinázy LCK (z angl. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), což vede k poklesu DNA-vazebné aktivity nukleárních faktorů NF-AT a NF- $\kappa$ B.

To následně vede k inhibici produkce IL-2 a tím i ovlivnění aktivace naivních CD4+ T-buněk (Anguita et al. 2002b). Další molekulou izolovanou z klíštěcích slin, která zasahuje do dráhy NF- $\kappa$ B, je longistatin. Ten předchází translokaci NF- $\kappa$ B z cytoplazmy do jádra a chová se jako antagonist RAGE (z angl. receptor for advanced glycation endproducts), který zprostředkovává aktivaci imunitních buněk v místě zánětu. Longistatin také down-reguluje adhezivní molekuly a tím působí proti vzniku zánětu v místě kousnutí klíštětem (Anisuzzaman et al. 2014).

Dalším příkladem klíštěcích molekul ovlivňujících signální dráhu NF- $\kappa$ B jsou sialostatiny. Klíštěcí sialostatiny Sialo L2 a v menší míře i Sialo L oslabují dráhu ERK1/2 v dendritických buňkách aktivovaných přes TLR2 pomocí LTA (lipoteichoová kyselina) nebo infekcí *B. burgdorferi*. Vlivem Sialo L2 byla také snížena aktivace PI3K/Akt dráhy a také dráha NF- $\kappa$ B v reakci na LTA (Lieskovská et al. 2015). NF- $\kappa$ B spolu s p38 MAP kinázou jsou v DC zásadním způsobem zapojeny do exprese prozánětlivých cytokinů (Anguita et al. 2002a), zatímco PI3K je nezbytná pro optimální průběh fagocytózy (Shin et al. 2009). Potlačení zmíněných signálních drah vlivem klíštěcích slin tak vede k narušení fyziologických funkcí DC a následně k modulaci imunitní odpovědi prostřednictvím fagocytózy či tvorby cytokinů a chemokinů.

### 3 Materiály a metody

#### 3.1 Materiály

##### 3.1.1 Myši

V rámci této práce byly použity samice inbredních myši kmene C57BL/6 (AnLab) ve stáří šest až osm týdnů. Z myši se získávala kostní dřev, z níž se následně izolovaly žírné buňky. Myši byly chovány za podmínek vyžadující bariérový chov ve zvěřinci Katedry medicínské biologie na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích.

##### 3.1.2 Klíšťata a sliny

Pro získávání slin byly použity dospělé samičky klíšťat *Ixodes ricinus*, které se získávaly pomocí vlajkové metody v okolí města České Budějovice.

##### 3.1.3 Žírné buňky

- Buněčná linie MC/9

Jedná se o linii myších žírných buněk závislých na růstových faktorech, dodavatelem byla firma ATCC. MC/9 buněčná linie byla kultivována v médiu MC/9 médiu (viz tabulka I). Pasáž byla prováděna 3x týdně.

**Tabulka I:** Složení MC/9 média.

MC/9 médium	Dodavatel
D-MEM	Biowest
10% BOFES	Biowest
2,2mM L-glutamin	Biowest
Penicilin (100 g/ml), Streptomycin sulfát (100 µg/ml), Amphotericin B (0,25 µg/ml)	Biowest
Merkaptoethanol (1:10000)	Sigma-Aldrich
10% Rat T-Stim	B&D Biosciences

- BMMC – primární žírné buňky

Primární žírné buňky byly derivovány z kostní dřeně myši (viz kapitola 3.2.2.) a kultivovány v médiu IMDM obohaceném o sérum a tři cytokiny (viz tabulka II).

**Tabulka II:** Složení BMMC média.

<b>BMMC médium</b>	<b>Dodavatel</b>
IMDM	Biowest
10% BOFES	Biowest
2,2mM L-glutamin	Biowest
Penicilin (100 g/ml), Streptomycin sulfát (100 µg/ml), Amphotericin B (0,25 µg/ml)	Biowest
1% Na pyruvát	GIBCO
IL-3, Recombinant Murine IL-3 (20 U/ml)	Laskavě poskytnuto prof. Edgarem Schmittem z Mainz, Německo; PeptoTech
Mouse IL-4 (50 U/ml), Recombinant Murine IL-4 (12,5 U/ml)	Cell Signaling; PeptoTech
Kit-ligand (200 ng/ml), Recombinant Murine SCF (50 ng/ml)	Laskavě poskytnuto prof. Edgarem Schmittem z Mainz, Německo; PeptoTech

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Slintání klíšťat

Samičky klíšťat se nechaly 6-7 dní sát na morčatech, poté se opláchly v 15 % etanolu a pomocí lepicí pásky se připevnilly na podložní sklíčko. Pomocí plastelíny se pak upevnila kapilára, která se pod binolupou klíšťatům nasadila na hypostom a jednu palpu. Nakonec se na hřbet klíšťat nakapal 1-2 µl (v závislosti na velikosti klíštěte) roztoku 5 % pilocarpinu (Sigma-Aldrich) v 96 % etanolu, pro podpoření slintání a klíšťata se v krabičkách s navlhčeným filtračním papírem uložila do termostatu (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C). Kapiláry byly průběžně kontrolovány, případně znovu nasazeny a po dvou hodinách se všechny kapiláry odebraly a jejich obsah byl vyprázdněn do zkumavky a držen na ledu.

Takto získané sliny se poté přefiltrovaly přes 0,22 µm filtr (Millex<sup>®</sup>-GV, Merck) a změřila se koncentrace obsažených proteinů metodou podle Bradfordové (Bradford 1976). Přefiltrované sliny byly uchovávány při -75°C do dalšího použití.

### 3.2.2 Izolace BMBC

Myši byly usmrceny zlomením vazů. Po odstranění a očištění končetin se z holenních a stehenních kostí vyizolovala kostní dřev a rozsuspendovala se v 1x MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma). Suspenze se přefiltrovala přes 70 µm filtr (Corning, nylon) a centrifugovala 10 minut při 160 g a 4°C. Buněčný pelet se rozsuspendoval ve 2 ml 0,84 % NH<sub>4</sub>Cl ohřátého na 37°C, čímž došlo k lýze erytrocytů. Po 2 minutách se lýza zastavila přidáním 10 ml 1x MEM, buňky se počítaly v Bürkerově komůrce, opět stočily a naředily v BMBC médiu na koncentraci 3x10<sup>6</sup>/ml. Buněčná suspenze se rozdělila do 24-jamkového panelu po 1 ml na jamku. Třikrát týdně bylo odebráno 0,5 ml média se suspenzními buňkami z každé jamky a přeneseno do nových jamek, ke kterým bylo následně přidáno 0,5 ml čerstvého média. Buňky byly kultivovány po dobu 3-4 týdnů v termostatu při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Derivace byla prováděna s modifikacemi dle protokolů (Kasakura et al. 2014; Stassen et al. 2006). Takto připravené buňky byly následně použity v experimentech.

Úspěšnost derivace žírných buněk byla ověřena pomocí průtokové cytometrie. 2x10<sup>5</sup> vyderivovaných buněk bylo stočeno (při 160 g a 4°C) a promyto PBS s 1 % BOFES. Poté byly buňky označeny pomocí protilátek proti CD117 (c-Kit) a FcεR od firmy eBioscience (anti-myší CD117 konjugovaná s FITC a anti-myší FcεR1α konjugovaná s PE), inkubace probíhala 20 minut v temnu a na ledu. Po dalším promytí byly buňky měřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto II. Populace vyderivovaných buněk obsahovala 87% buněk pozitivních na CD117 a 88% pozitivních na FcεR.

### 3.2.3 Příprava buněk

Pro sledování hladin cytokinů a chemokinů pomocí proteomové array byly primární žírné buňky nasazeny do 48-jamkového panelu v koncentraci 6x10<sup>5</sup>/500 µl BMBC média (bez cytokinů) na jamku.

Pro sledování hladin cytokinů a chemokinů pomocí Elisa testu byly BMBC nasazeny v triplicátech do 96-jamkového panelu v koncentraci 1,5x10<sup>5</sup>/200 µl BMBC média (bez cytokinů) na jamku.

Buňky byly preinkubovány 2h s klíštěcími slinami (10 µg/ml) a následně stimulovány ionomycinem (Sigma-Aldrich) v konečné koncentraci 1µM. Po 24h inkubaci při 37°C s 5 % CO<sub>2</sub> se do čistých mikrozkupek odebíral supernatant, který byl použit k vlastní analýze.

### 3.2.4 Detekce cytokinů a chemokinů v aktivovaných žírných buňkách

- Cytokinová array - Proteome Profiler™ Array – Mouse Cytokine Array Panel A

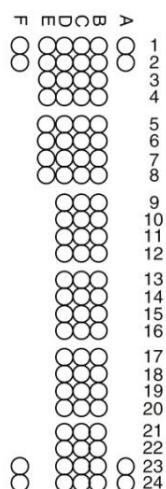
Relativní množství cytokinů a chemokinů bylo stanovováno pomocí Proteome Profiler Array – Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems), kdy je možné současně sledovat hladinu 40 různých cytokinů a chemokinů (tabulka III). Pozice jednotlivých cytokinů a chemokinů na membráně je zobrazena na obrázku 6. Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Měření chemiluminiscence probíhalo v přístroji Alliance 4.7, Gel Documentation Systems, UVITEC Cambridge. Intenzita signálu byla vyhodnocena v programu UviBand (UVIBAND analysis software, UVITEC Cambridge).

**Tabulka III:** Seznam cytokinů a chemokinů (Proteome Profiler™ Array).

Souřadnice	Cíl
A1, A2	Pozitivní kontrola
A23, A24	Pozitivní kontrola
B1, B2	BLC
B3, B4	C5a
B5, B6	G-CSF
B7, B8	GM-CSF
B9, B10	I-309
B11, B12	Eotaxin
B13, B14	ICAM-1
B15, B16	IFN-γ
B17, B18	IL-1α
B19, B20	IL-1β
B21, B22	IL-1ra
B23, B24	IL-2
C1, C2	IL-3
C3, C4	IL-4
C5, C6	IL-5
C7, C8	IL-6
C9, C10	IL-7
C11, C12	IL-10



C13, C14	IL-12p70
C15, C16	IL-13
C17, C18	IL-16
C19, C20	IL-17
C21, C22	IL-23
C23, C24	IL-27
D1, D2	IP-10
D3, D4	I-TAC/CXCL11
D5, D6	KC/CXCL1
D7, D8	M-CSF
D9, D10	JE/MCP-1
D11, D12	MCP-5
D13, D14	MIG
D15, D16	MIP-1 $\alpha$
D17, D18	MIP-1 $\beta$
D19, D20	MIP-2
D21, D22	RANTES/CCL5
D23, D24	SDF-1
E1, E2	TARC/CCL17
E3, E4	TIMP-1
E5, E6	TNF- $\alpha$
E7, E8	TREM-1
F1, F2	Pozitivní kontrola
F23, F24	Negativní kontrola



**Obrázek 6:** Pozice cytokinů a chemokinů na membráně (Proteome Profiler™ Array).

- Elisa test - cytokiny

Koncentrace vybraných cytokinů byla stanovována za použití Ready-Set-GO! ELISA Kitu (eBioscience). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních destičkách

(Costar) dle návodu dodaného výrobcem. K dokončení reakce byl použit 1x TMB ELISA substrate solution (eBioscience), k zastavení reakce byla použita 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance byla měřena vertikálním spektrofotometrem (Synergy H1 microplate reader, BioTek) při 450 nm. Supernatant byl testován na přítomnost cytokinů IL-4, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ .

- Elisa test – chemokiny

Pro stanovení koncentrace chemokinů byly použity kity firmy PeproTech - Murine MIP-2 Mini ELISA Development Kit, Murine JE (MCP-1) Mini ELISA Development Kit a Murine IL-3 Mini ABTS ELISA Development Kit. Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních destičkách (Costar), postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. K dokončení reakce byl použit 1x TMB ELISA substrate solution (eBioscience), k zastavení reakce byla použita 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance byla měřena na vertikálním spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader, BioTek) při 405 nm. Supernatant byl testován na MIP-2, MCP-1 a IL-3.

### 3.2.5 Sledování aktivity signálních molekul

- Signální array – PathScan<sup>®</sup> Intracellular Signaling Array

BMMC byly nasazeny do 24-jamkového panelu v koncentraci 1x10<sup>6</sup>/500  $\mu$ l BMMC média na jamku. Poté byly buňky preinkubovány 2h s klíštěcími slinami (10  $\mu$ g/ml) a následně stimulovány ionomycinem (1 $\mu$ M). V intervalu 5, 30 a 60 minut od stimulace byla reakce zastavena přenesením panelu na led. Buňky byly přeneseny do mikrozkuhavek, opláchnuty sterilním chlazeným PBS a stočeny (5 minut, 252 g, 4°C). K peletu buněk bylo přidáno 80  $\mu$ l lyzačního roztoku (PathScan Cell Lysis Buffer obsahující 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1x koktejl inhibitorů proteáz (Sigma-Aldrich)). Lýza probíhala 5 minut na ledu. Vzniklý lyzát byl centrifugován 10 minut při 11180 g a 4°C a skladován při -75°C.

Hladina aktivovaných signálních molekul ve vzorcích byla zjišťována pomocí PathScan<sup>®</sup> Intracellular Signaling Array (Chemiluminescent Readout, Cell signaling), kdy je možné současně detekovat aktivitu 18 různých signálních molekul, převážně kináz (viz tabulka IV). Signální molekuly označené hvězdičkou nejsou v myších vzorcích rozeznávány. Pozice jednotlivých signálních molekul na sklíčku je zobrazena na obrázku 7. Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Měření

chemiluminiscence probíhalo v přístroji Alliance 4.7, Gel Documentation Systems, UVITEC Cambridge. Intenzita signálu byla vyhodnocena v programu UviBand (UVIBAND analysis software, UVITEC Cambridge).

**Tabulka IV:** Intracelulární signální molekuly a jejich modifikace (PathScan® Intracellular Signaling Array).

	<b>Cíl</b>	<b>Místo fosforylace</b>	<b>Modifikace</b>
<b>1</b>	Pozitivní kontrola	-	-
<b>2</b>	Negativní kontrola	-	-
<b>3</b>	ERK1/2	Thr202/Tyr204	Fosforylace
<b>4</b>	Stat1	Tyr701	Fosforylace
<b>5</b>	Stat3	Tyr705	Fosforylace
<b>6</b>	Akt	Thr308	Fosforylace
<b>7</b>	Akt	Ser473	Fosforylace
<b>8</b>	AMPK $\alpha$	Thr172	Fosforylace
<b>9</b>	S6 Ribosomal protein	Ser235/236	Fosforylace
<b>10</b>	mTOR	Ser2448	Fosforylace
<b>11</b>	HSP27*	Ser78	Fosforylace
<b>12</b>	Bad	Ser112	Fosforylace
<b>13</b>	p70 S6 Kinase	Thr389	Fosforylace
<b>14</b>	PRAS40	Thr246	Fosforylace
<b>15</b>	p53	Ser15	Fosforylace
<b>16</b>	p38	Thr180/Tyr182	Fosforylace
<b>17</b>	SAPK/JNK	Thr183/Tyr185	Fosforylace
<b>18</b>	PARP*	Asp214	Štěpení
<b>19</b>	Caspase-3*	Asp175	Štěpení
<b>20</b>	GSK-3 $\beta$	Ser9	Fosforylace



**Obrázek 7:** Pozice signálních molekul na sklíčku (PathScan® Intracellular Signaling Array).

- Western Blotting

#### PŘÍPRAVA LYZÁTU

BMBC a MC/9 buňky byly nasazeny do 48-jamkového panelu v koncentraci 0,5-1x10<sup>6</sup>/500-1000  $\mu$ l BMBC nebo MC/9 média na jamku. Poté byly buňky

preinkubovány 2h s klíštěcími slinami (10 µg/ml) a následně stimulovány ionomycinem (1µM). V intervalu 10, 30 a 60 minut od stimulace byla reakce zastavena přenesením panelu na led. Buňky byly přeneseny do mikrozkušavek, opláchnuty sterilním chlazeným PBS a centrifugovány (5 minut, 252 g, 4°C). K peletu bylo přidáno 80 µl lyzačního roztoku (RIPA pufr, 25mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1x koktejl inhibitorů proteáz) a lýza probíhala 5 minut na ledu. Vzniklý proteinový extrakt byl centrifugován 10 minut při 11180 g a 4°C a skladován při -75°C.

#### POLYAKRYLAMIDOVÁOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA ZA REDUKUJÍCÍCH PODMÍNEK (SDS-PAGE)

Proteinový extrakt se po rozmrazení smíchal se vzorkovým pufrům obsahující β-merkaptoethanol (900 µl 4x Laemmli Sample Buffer + 100 µl β-ME, Bio-Rad) v poměru 3:1 a nechal se 5 minut zahřívat na 95°C. Po zchlazení se nanášel na gel v množství 20 µl na jamku. Rozdělení proteinů probíhalo v 8 % polyakrylamidovém gelu za redukcí v ELFO pufru (26 mM TRIS, 192 mM Glycine, 3,5 M SDS) podle Laemmliho (Laemmli 1970). Zdroj elektrického proudu pro průběh elektroforézy byl nastaven na 40 mA na jeden gel. Elektroforéza poté probíhala 45-60 minut při napětí 250V.

#### SEMI-DRY WESTERN BLOTTING

Gel s rozdělenými proteiny se propláchl v transferovém pufru (25,6 mM TRIS, 192 mM glycin, 1,73 mM SDS, 20 % methanol). Membrána (PVDF, Thermo Scientific) se krátce promyla 100 % metanolem a poté opláchnula v transferovém pufru. Přenos proteinů na membránu probíhal v přístroji Semi-Dry Blotter (Scie-Plas). Zdroj elektrického proudu byl nastaven na 64 mA a napětí 150 V na jeden gel, přenos trval 1 hodinu a 10 minut. Membrána se poté promyla v promývacím roztoku TBS s 0,1 % Tweenem (19 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20). Promytá membrána byla 1 hodinu blokována v 5 % mléce (sušené odtučněné mléko v TBS s 0,1 % Tweenem) při laboratorní teplotě a poté přes noc inkubována při 4°C s příslušnou protilátkou rozmíchanou v mléce. Protilátky, které byly použity k detekci proteinů, jsou uvedeny v tabulce V. Membrána byla druhý den promývána 1x 15 minut a 2x 5 minut v promývacím roztoku. Po promytí se membrána inkubovala 45 minut při laboratorní teplotě s příslušnou sekundární protilátkou (Anti-Rabbit IgG HRP-linked, Anti-Mouse IgG HRP-linked, Cell Signaling). Poté byla 3x promyta promývacím roztokem. Substrátové roztoky byly smíchány v poměru 1:1 bezprostředně před použitím. Byly používány dva typy substrátových roztoků, Detection

reagent 1 a 2 od firmy Thermo Scientific a roztoky Western Bright Quantum (Western Blotting Detection Kit) od firmy Advansta. Měření probíhalo v přístroji Alliance 4.7, Gel Documentation Systems, UVITEC Cambridge. Vyhodnocení bylo prováděno v programu ImageJ. Zpracování dat do grafů bylo provedeno v programu MS Excel. Nárůst aktivity signálních molekul oproti nestimulované kontrole je pokládán za 100 % v každém jednotlivém intervalu.

**Tabulka V:** Protilátky používané k detekci proteinů.

<b>Fosforylovaný protein</b>	<b>Ředění</b>	<b>Totální protein</b>	<b>Ředění</b>	<b>Dodavatel</b>
p-Akt (Ser473)	1:1000	Akt1	1:1000	Cell Signaling
β-actin	1:1000	-	-	Cell Signaling
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	1:1000	ERK1/2	1:5000	Cell Signaling, Enzo Life Science
p-NF-κB p65 (S536)	1:1000	NF-κB (p65)	1:1000	Cell Signaling
p-p38 (T180/Y182)	1:1000	p38	1:200	Cell Signaling, Enzo Life Science

### STRIPOVÁNÍ

Stripování membrány probíhalo 20 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Pro odváznání protilátek z membrány byl použit stripovací pufr Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific). Po stripování se membrána promývala 1x 10minut a 1x 5 minut v promývacím roztoku TBS s 0,1 % Tweenem.

### 3.2.6 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno v programu GraphPad Prism pomocí dvoucestné analýzy variance a Bonferroniho post-testu v případě signální a cytokinové array a pomocí jednocestné analýzy variance a Bonferroniho post-testu v případě Elisa testů. Hvězdičky v grafech označují statisticky významné rozdíly mezi skupinami, kdy jedna hvězdička značí  $P < 0,05$ , dvě  $P < 0,01$ , tři  $P < 0,001$  a čtyři  $P < 0,0001$ . Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako aritmetický průměr naměřených hodnot  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).

## 4 Cíle práce

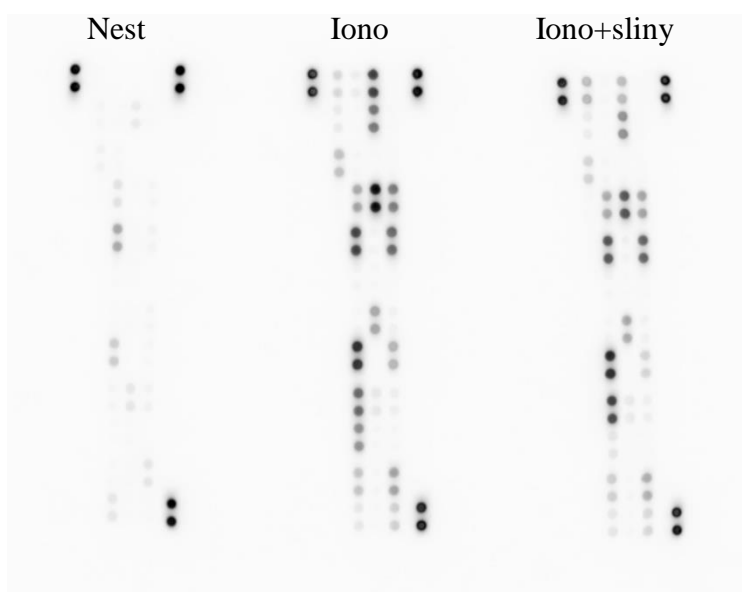
1. Vliv klíštěcích slin na produkci cytokinů a chemokinů žírnými buňkami po stimulaci ionomycinem
  - a) Využití proteomové cytokinové array.
  - b) Potvrzení výsledků pomocí Elisa testu.
2. Vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah v žírných buňkách po stimulaci ionomycinem
  - a) Využití signální array.
  - b) Testování vybraných signálních molekul pomocí Western blottingu.
3. Navrhnout potenciální mechanismus, kterým klíštěcí sliny ovlivňují produkci cytokinů s ohledem na testované signální dráhy.

## 5 Výsledky

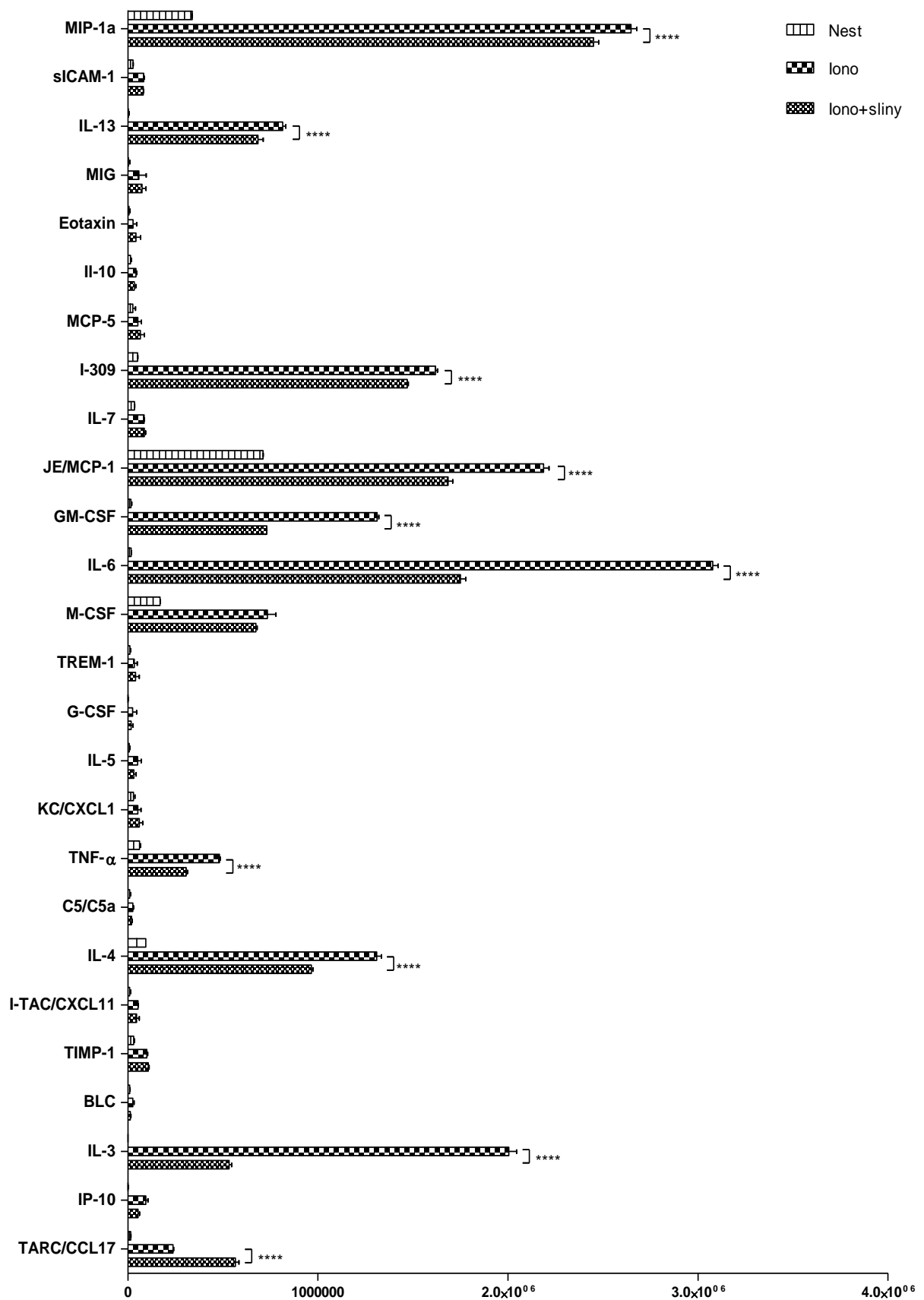
### 5.1 Ovlivnění produkce cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaký vliv mají klišťecí sliny na produkci cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami. Buňky byly preinkubovány 2 h s klišťecími slinami a stimulovány ionomycinem po dobu 24 h. Poté byl analyzován supernatant. Přesný postup je uveden v kapitole 3.2.4.

Na obrázku 9 a 10 jsou uvedeny grafy znázorňující hladiny cytokinů a chemokinů produkovaných primárními žírnými buňkami. Data pochází z analýzy vzorků získaných pomocí proteomové array (obrázek 8). Můžeme vidět, že ze všech čtyřiceti různých cytokinů, chemokinů a jiných molekul, které array zahrnuje, došlo po stimulaci buněk ionomycinem zhruba u třetiny z nich ke zvýšení produkce. Konkrétně se jednalo o IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IL-1RA, TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, MCP-1, I-309, MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-2, RANTES a slabý nárůst byl pozorován i u TARC a IL-2. Většina z nich byla také ovlivněna slinami. Statisticky významného snížení produkce vlivem klišťecích slin došlo v případě IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IL-1RA, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1, I-309, MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-2 a RANTES. Naopak ke zvýšení došlo v případě MIP-1 $\beta$  a TARC a i tento rozdíl byl v obou případech statisticky signifikantní.

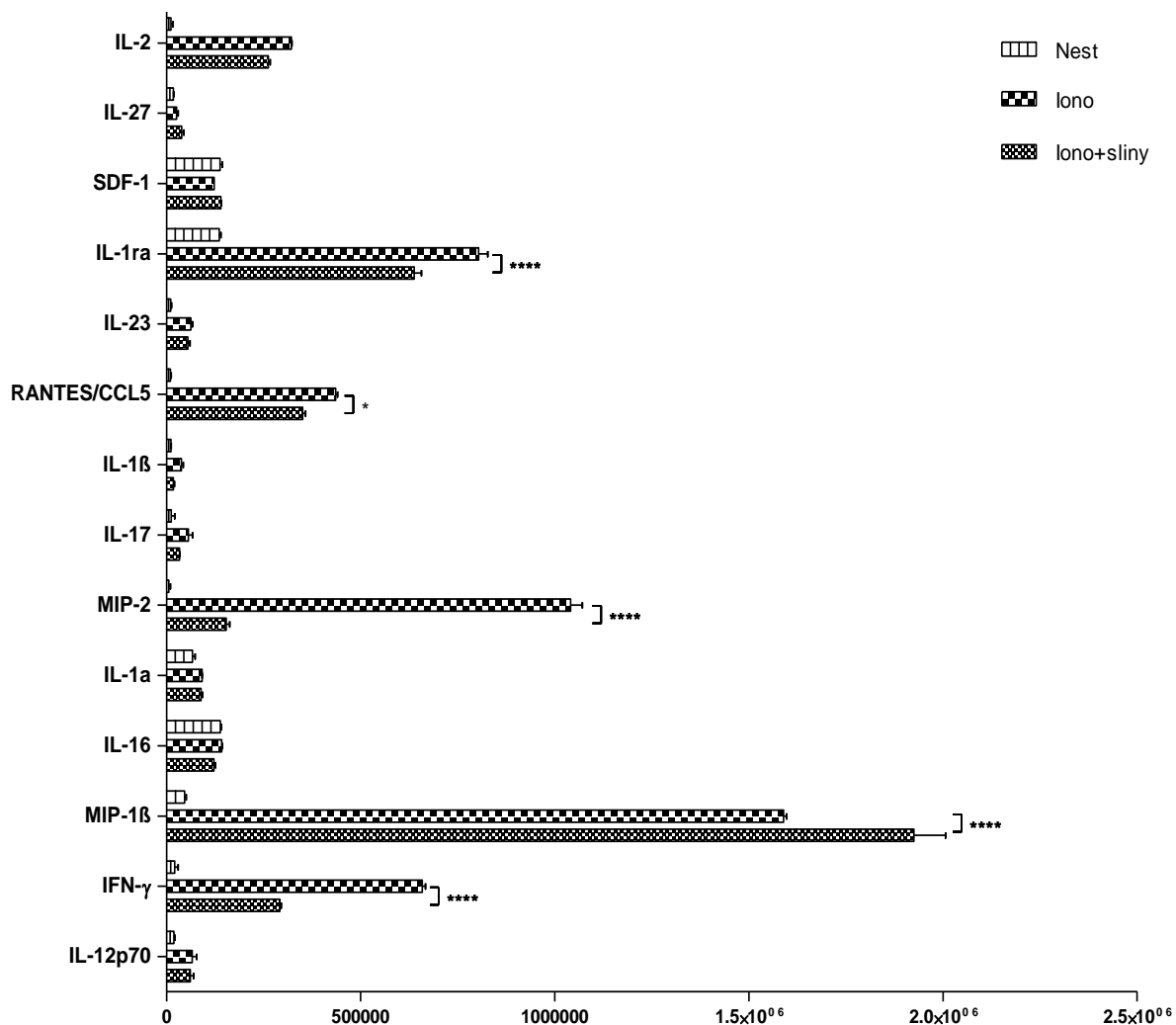


**Obrázek 8:** Vliv klišťecích slin na produkci cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami; cytokinová array.



**Obrázek 9:** Vliv klíčících slin na produkci cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami, část 1 (\* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

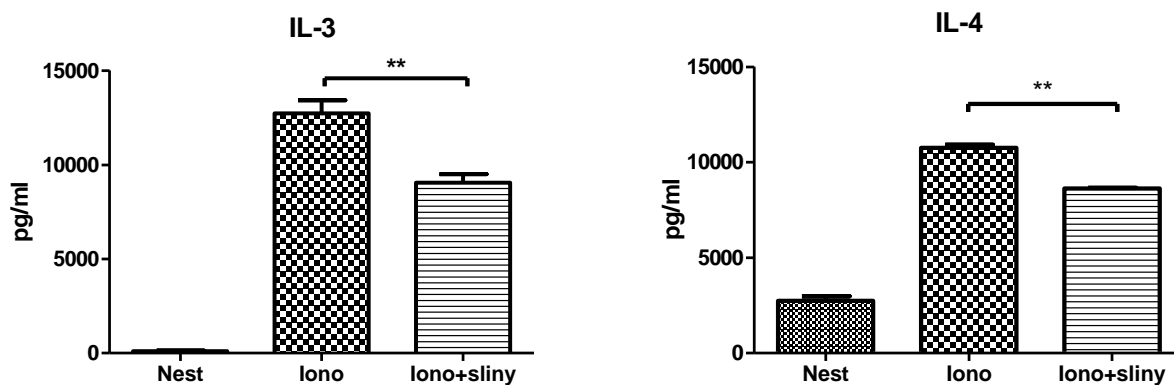




**Obrázek 10:** Vliv klíččích slin na produkci cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami, část 2 (\* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\* P<0,0001).

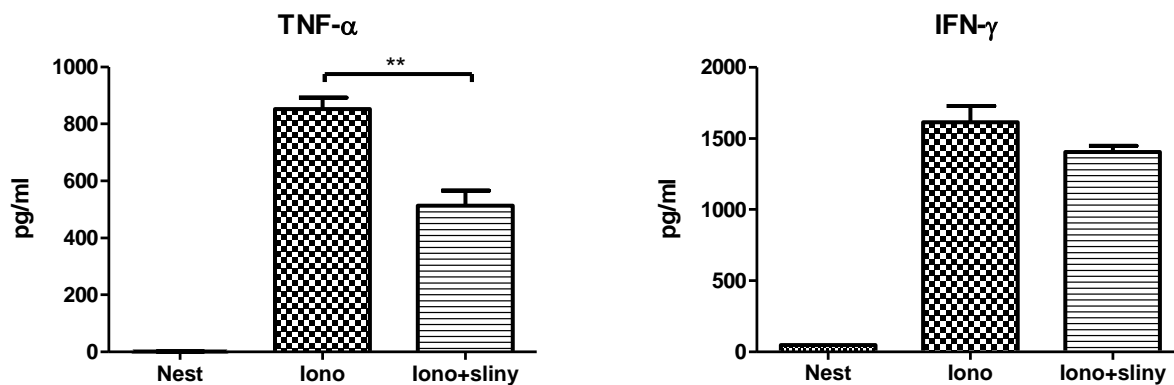
Pro ověření výsledků z proteomové array se provádělo testování pomocí Elisa testu. Všechny experimenty, kde byla sledována koncentrace cytokinů a chemokinů pomocí Elisa testu, byly provedeny nejméně dvakrát.

Sledovaly se hladiny IL-3, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP-2 a MCP-1. Na obrázku 11 jsou zobrazeny grafy, znázorňující produkci dvou cytokinů účastnících se Th2 odpovědi, IL-3 a 4. Produkce IL-4 primárními žírnými buňkami je po stimulaci ionomycinem výrazně zvýšená a po preinkubaci buněk s klíččícími slinami dochází k signifikantnímu poklesu (P <0,01), a to o 27 %. Produkce IL-3 po stimulaci BMMC také výrazně roste. Po jejich preinkubaci se slinami došlo k signifikantnímu poklesu produkce IL-3 o 29 %.



**Obrázek 11:** Vliv klíštěcích slin na produkci IL-3 a IL-4 primárními žírnými buňkami (\*\* P <0,01).

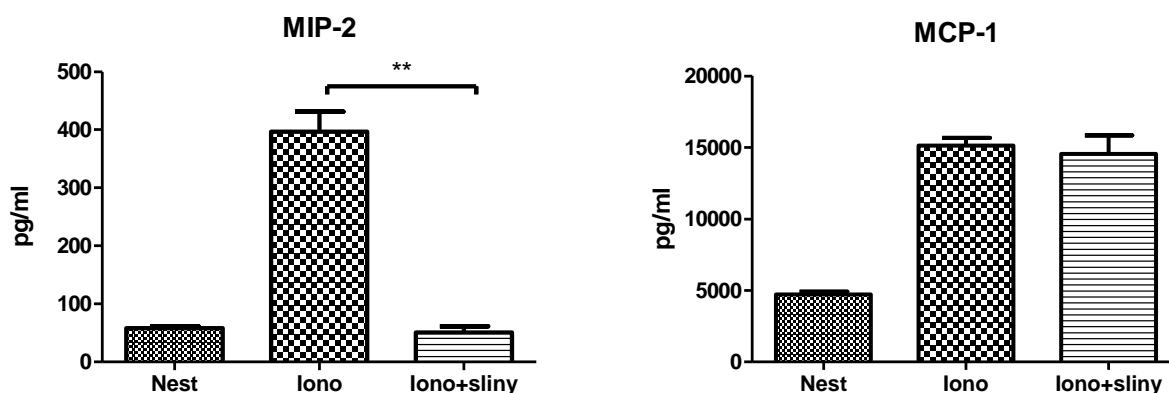
Dále byla sledována produkce prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . Testování produkce TNF- $\alpha$  přineslo podobné výsledky jako u předchozích dvou interleukinů (obrázek 12). Po stimulaci BMDC ionomycinem došlo k velmi výrazné produkci TNF- $\alpha$ , která byla vlivem slin snížena o 40%. Tento rozdíl byl signifikantní (P <0,01). V případě IFN- $\gamma$  dochází po aktivaci BMDC ionomycinem také k výrazné produkci tohoto cytokinu, nicméně vliv slin není příliš výrazný a snížení tak není signifikantní (13%).



**Obrázek 12:** Vliv klíštěcích slin na produkci TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  primárními žírnými buňkami (\*\* P <0,01).

K dalšímu testování byly vybrány dva chemokiny, jejichž produkce byla ionomycinem i slinami výrazně ovlivněna. Produkce MIP-2 primárními žírnými buňkami byla výrazně zvýšena po stimulaci buněk a došlo také k velmi silnému poklesu vlivem klíštěcích slin (obrázek 13). Produkce tohoto chemokinu byla potlačena na úroveň kontroly a tento rozdíl byl statisticky signifikantní (P <0,01). V případě MCP-1 naopak nedošlo vlivem slin

k ovlivnění produkce a nepodařilo se tak potvrdit inhibiční vliv slin na tento chemokin, který naznačovala data z proteomové array.



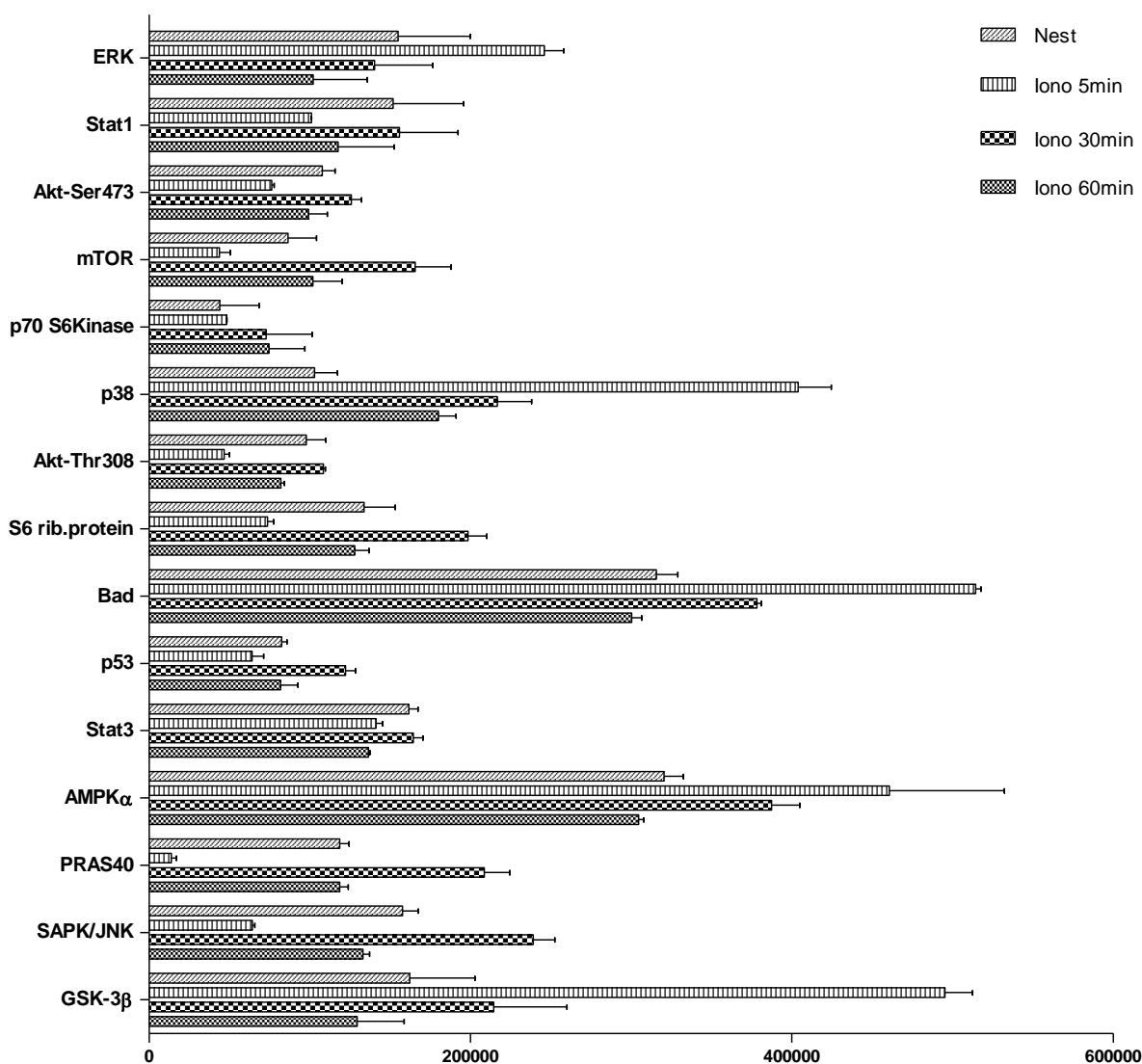
**Obrázek 13:** Vliv klíštěcích slin na produkci MIP-2 a MCP-1 primárními žírnými buňkami (\*\* P <0,01).

## 5.2 Ovlivnění signálních molekul v žírných buňkách

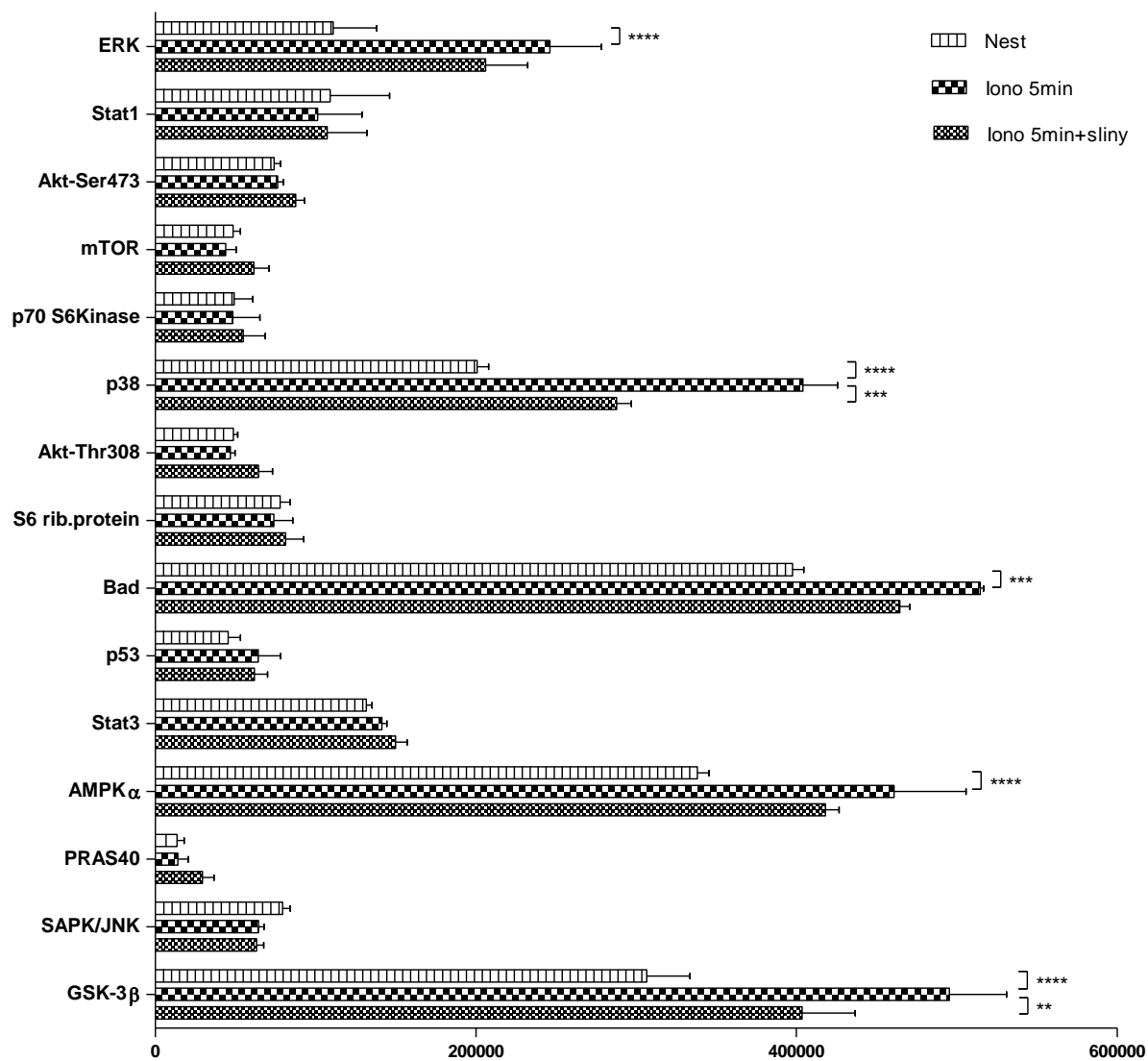
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaké signální molekuly jsou v žírných buňkách po jejich stimulaci aktivovány a ovlivněny klíštěcími slinami. Pro širší pohled do aktivity signálních molekul v primárních žírných buňkách byla v první řadě provedena signální array, která zároveň detekuje 15 intracelulárních signálních molekul. Array byla prováděna na vzorcích z primárních žírných buněk. Postup experimentu je uveden v kapitole 3.2.5.

Graf na obrázku 14 znázorňuje aktivaci signálních molekul v intervalu 5, 30 a 60 minut od stimulace BMMC ionomycinem. Každá signální molekula vykazuje jinou kinetiku. U některých byla zaznamenána nejvyšší aktivita po 30 minutách, nicméně u pěti molekul došlo k nejvýraznější aktivaci již po 5 minutách. Z tohoto důvodu byl ke sledování vlivu klíštěcích slin zvolen pětiminutový interval, kde se předpokládala výrazná aktivace ERK1/2 MAP kinázy, p38 MAP kinázy, pro-apoptického proteinu Bad a kináz AMPK $\alpha$  a GSK-3 $\beta$ . Graf na obrázku 15 znázorňuje aktivitu signálních molekul v intervalu 5 minut od stimulace BMMC ionomycinem, kde můžeme vidět, že po stimulaci došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity zmíněných signálních molekul (snímek z arraye je na obrázku 16). Dále je patrné, že klíštěcí sliny snižují aktivitu těchto molekul a to o 30 % v případě ERK1/2, o 57 % v případě p38, o 43 % v případě Bad, o 35 % v případě AMPK $\alpha$

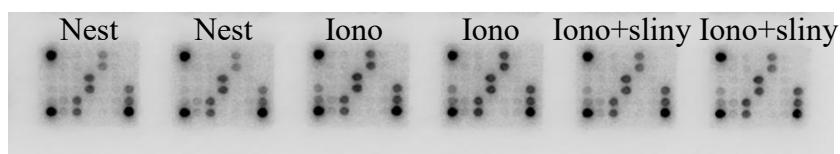
a o 49 % v případě GSK-3 $\beta$ . Některé z těchto kináz byly vybrány k dalšímu testování vlivu klíčících slin na jejich aktivitu. Dále byla vybrána Akt (Ser473) pro zjištění vlivu slin v delším intervalu a také byl přidán nukleární faktor NF- $\kappa$ B, který v array není zahrnut. Tyto vybrané signální molekuly se testovaly pomocí Western blottingu. K tomuto účelu byly používány jak primární žírné buňky, tak buněčná linie MC/9. Nejprve bylo nutné postup přizpůsobit tak, aby bylo možné detekovat aktivaci signálních molekul po stimulaci buněk. Testovala jsem různé koncentrace buněk, různé časové intervaly, ECL substráty a v některých případech i ředění protilátek. Konečný postup je uveden v kapitole 3.2.5



**Obrázek 14:** Relativní aktivita intracelulárních signálních molekul v BMDC v intervalech 5, 30 a 60 minut od stimulace ionomycinem.

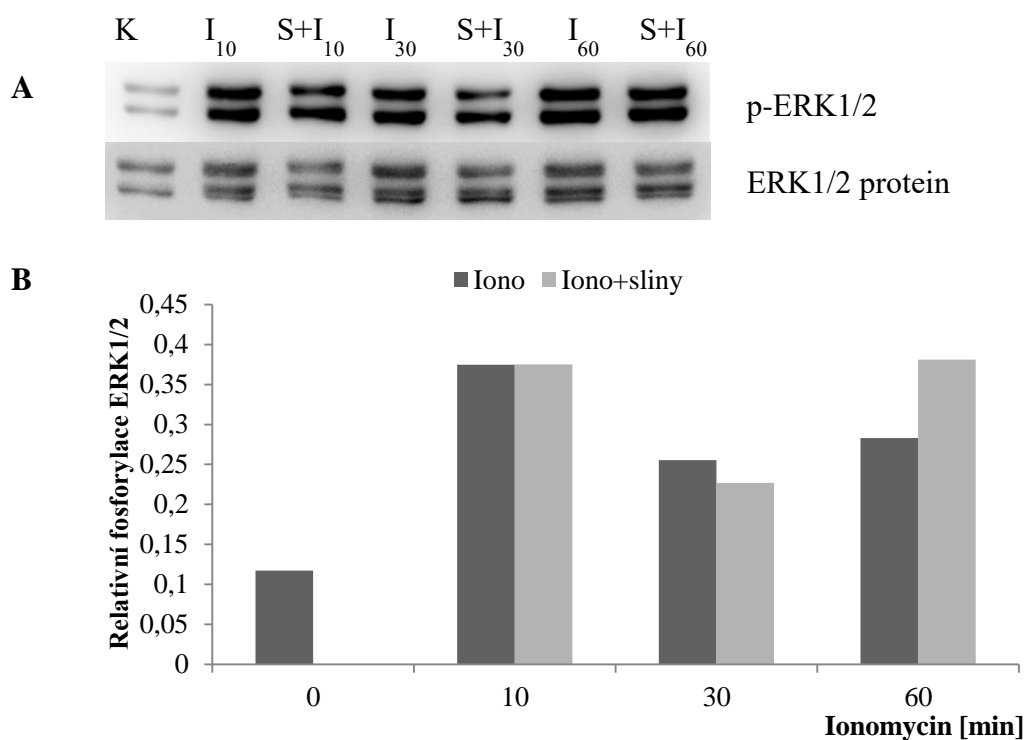


**Obrázek 15:** Vliv klíčících slin na intracelulární signální molekuly v BMMC 5 minut po stimulaci ionomycinem (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

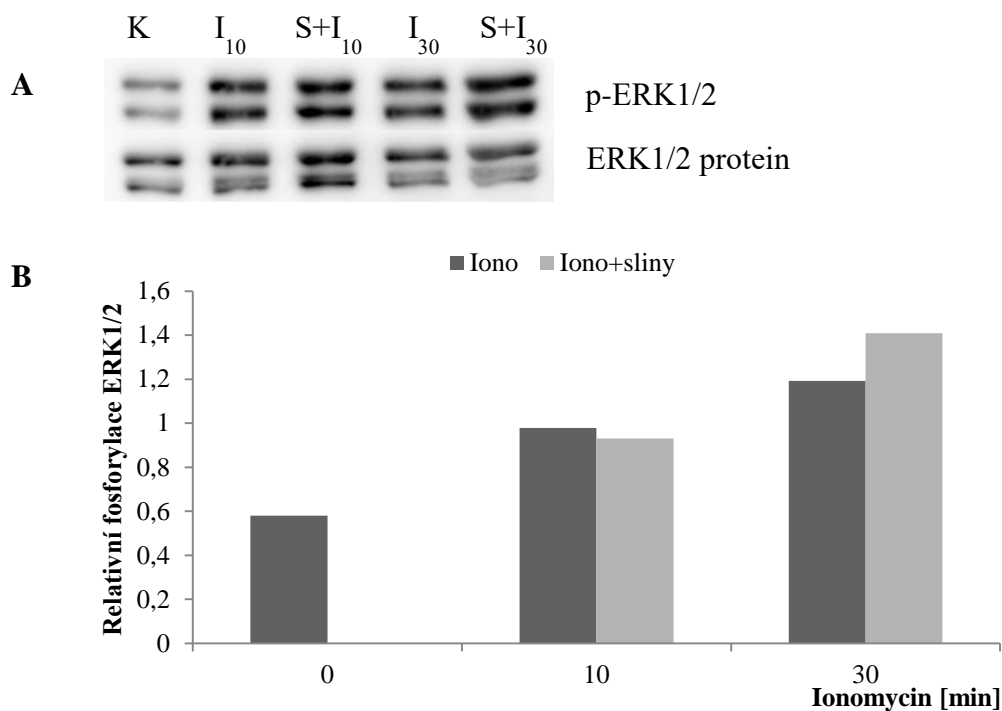


**Obrázek 16:** Vliv klíčících slin na intracelulární signální molekuly v BMMC 5 minut po stimulaci ionomycinem; signální array.

Nejprve se pomocí metody Western blottingu testovala aktivita ERK1/2 MAP kinázy, kde se ovšem inhibiční vliv slin, který naznačovala data ze signální array, potvrdit nepodařilo, a to ani v primárních žírných buňkách (obrázek 18), ani v linii MC/9 (obrázek 17). Z obou grafů je zřejmé, že po stimulaci obou typů MC dochází k aktivaci této kinázy. Nicméně jak se zdá, v MC/9 tuto kinázu klíštěcí sliny po 10 ani 30 minutách od stimulace buněk nijak neovlivňují. Naproti tomu po 60 minutách došlo k nárůstu její aktivity o 60 % oproti kontrole. V BMMC byl průběh podobný. Po 10 minutách nedošlo k žádnému ovlivnění slinami, po 30 minutách se aktivita kinázy zvýšila o 35 % oproti kontrole. Oba grafy vyjadřují poměr fosforylované formy ERK1/2 vůči totálnímu ERK1/2 proteinu, tedy relativní aktivitu ERK1/2.



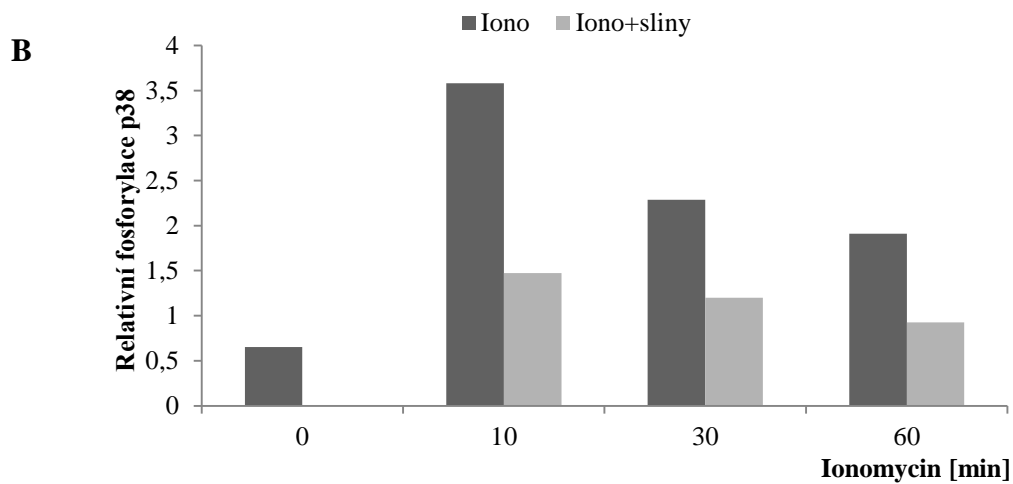
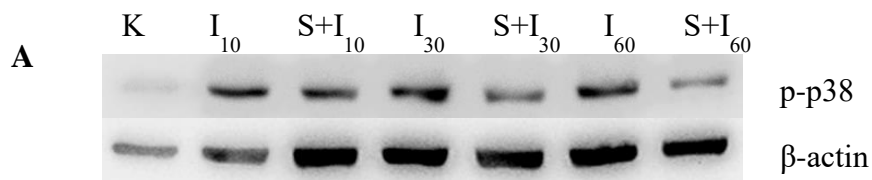
**Obrázek 17:** Vliv klíštěcích slin na aktivitu ERK1/2 MAP kinázy v MC/9.



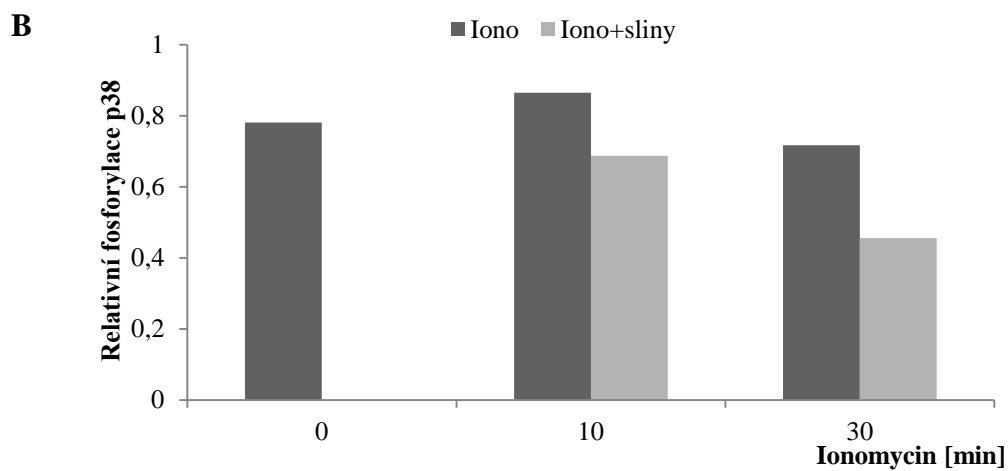
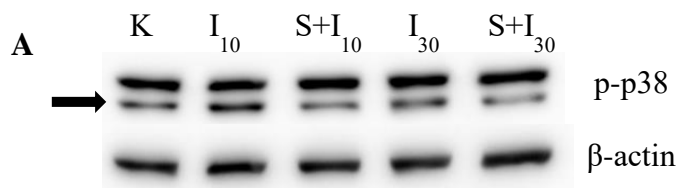
**Obrázek 18:** Vliv klíštěcích slin na aktivitu ERK1/2 MAP kinázy v BMMC.

Další signální molekula, která byla podle dat ze signální array silně aktivována ionomycinem a též signifikantně potlačena v přítomnosti klíštěcích slin, je p38 MAP kináza. Její aktivace po stimulaci ionomycinem a také ovlivnění klíštěcími slinami bylo sledováno opět v BMMC a v MC/9 pomocí Western blottingu.

V buněčné linii MC/9 byla zjištěna výrazná aktivace p38 po stimulaci buněk ionomycinem. Na obrázku 19B můžeme pozorovat průběh kinetiky. K nejvýraznější aktivaci došlo v intervalu 10 minut od stimulace MC/9. V intervalu 30 a 60 minut od stimulace se hladina aktivních molekul p38 postupně snižovala. Klíštěcí sliny pak aktivitu této kinázy výrazně ovlivňovaly. Inhibiční účinek byl v intervalu 10 minut od stimulace buněk 72 %, v intervalu 30 minut od stimulace došlo k potlačení aktivity p38 vlivem slin o 67 % a v intervalu 60 minut dokonce o 78 %. V BMMC byla detekována poměrně vysoká bazální hladina aktivované p38, vliv ionomycinu zde byl jen nepatrný. Klíštěcí sliny však i zde potlačovaly aktivitu dráhy p38. Míra aktivace p38 v buňkách preinkubovaných se slinami byla nižší, než ve vzorcích nestimulovaných buněk (obrázek 20B). Na obou grafech je vyneseno poměří fosforylované formy p38 vůči  $\beta$ -actinu, tedy relativní aktivita p38.



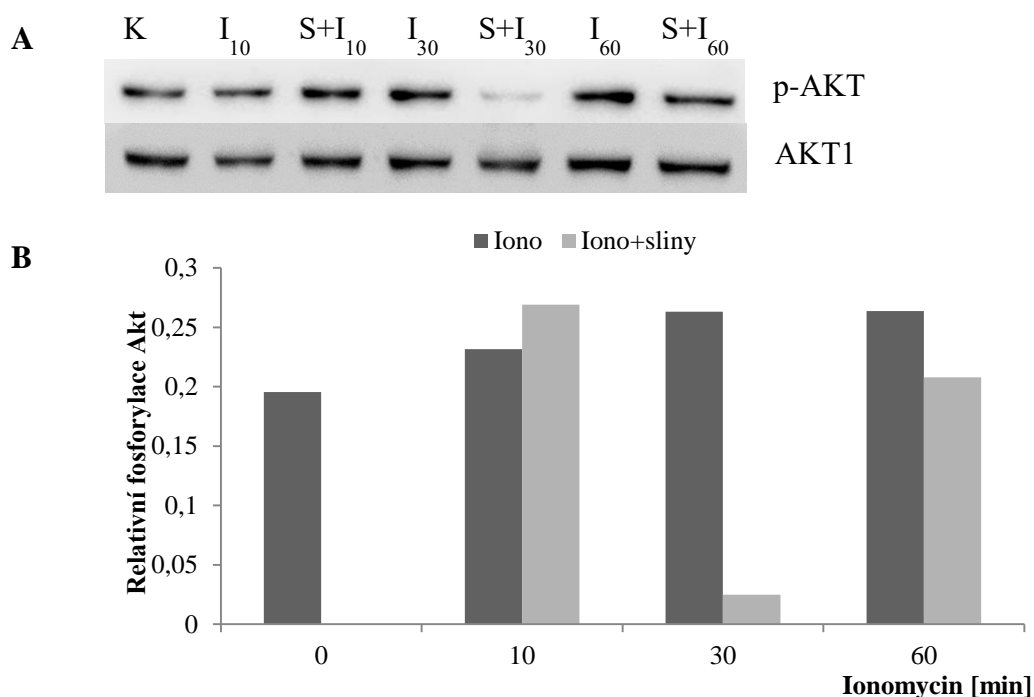
**Obrázek 19:** Vliv klíčkových slin na aktivitu p38 MAP kinázy v MC/9.



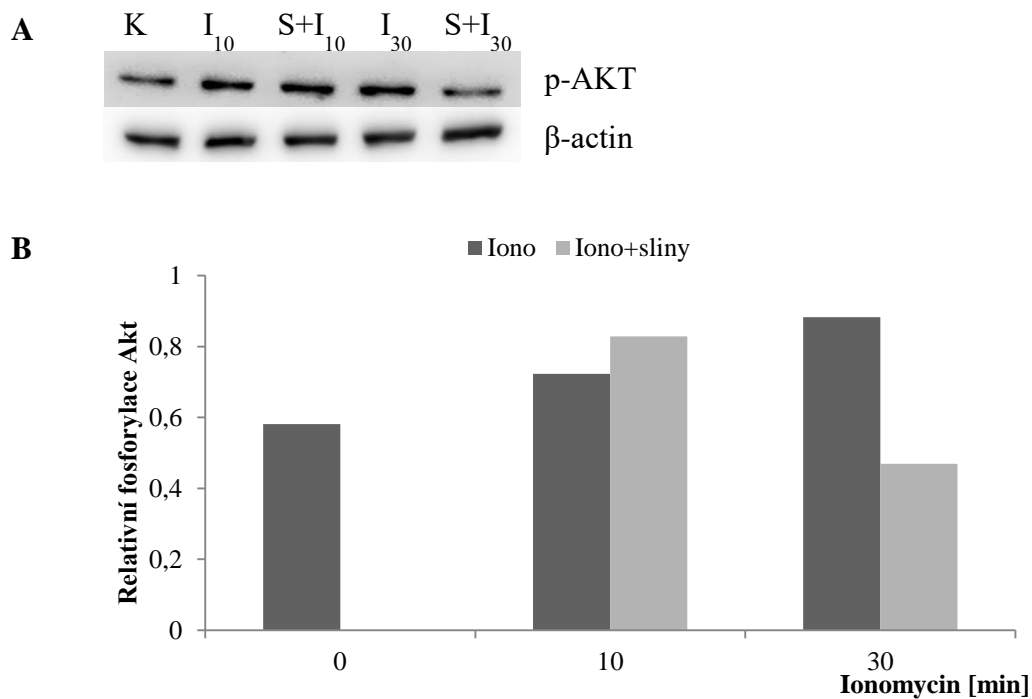
**Obrázek 20:** Vliv klíčkových slin na aktivitu p38 MAP kinázy v BMBC.



Z dat, která byla získána ze signální array, můžeme říci, že míra aktivace Akt (Ser473), na rozdíl od výše zmíněných kináz, dosahuje nejvyššího bodu v intervalu 30 minut od stimulace buněk (obrázek 14). V pětiminutovém intervalu nedošlo k ovlivnění aktivity Akt ani ionomycinem, ani slinami (obrázek 15). Podobné výsledky přineslo i testování pomocí Western blottingu. Na obrázcích 21B a 22B můžeme vidět, že v BMBC i v MC/9 je zachován podobný trend, kdy byla detekována relativně vysoká bazální hladina aktivované Akt (Ser473) a ionomycin vykazoval výraznější stimulační účinek až při 30 minutové inkubaci s buňkami. V intervalu 10 minut od stimulace byla pozorována vlivem klišťecích slin zvýšená aktivita Akt a to jak v MC/9 tak v BMBC. Nicméně v intervalu 30 minut od stimulace ionomycinem byl v obou typech buněk zaznamenán výrazný inhibiční vliv slin na tuto kinázu. Míra aktivace byla dokonce výrazně nižší než v kontrolních vzorcích. Obrázek 21B znázorňuje poměr fosforylované formy Akt vůči totálnímu proteinu AKT1 a obrázek 22B poměr p-Akt vůči  $\beta$ -aktinu.

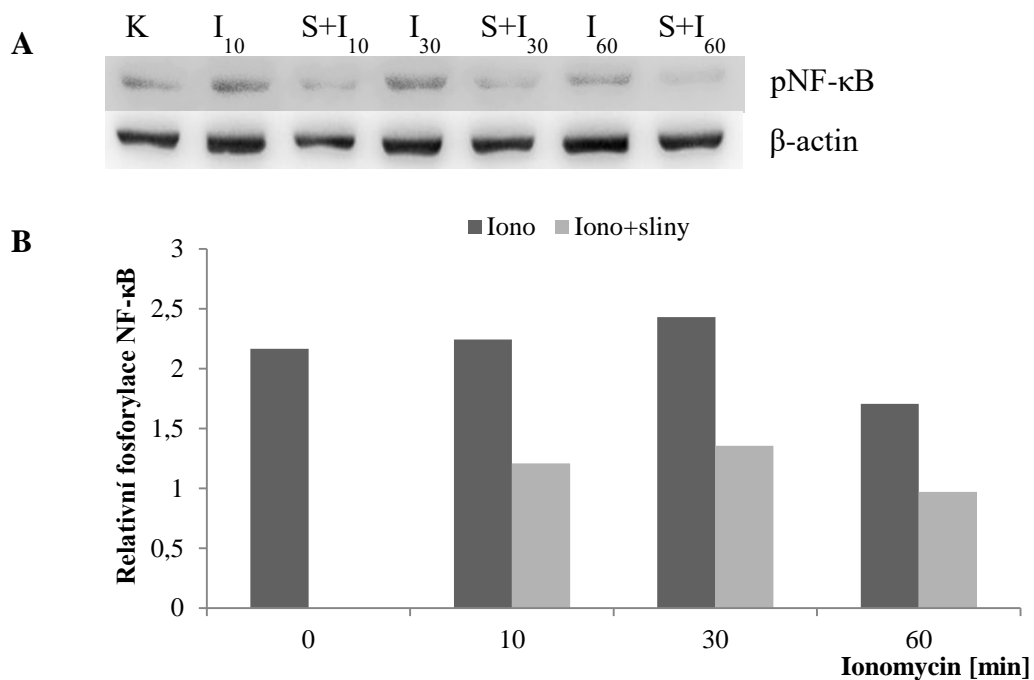


**Obrázek 21:** Vliv klišťecích slin na aktivitu Akt kinázy v MC/9.

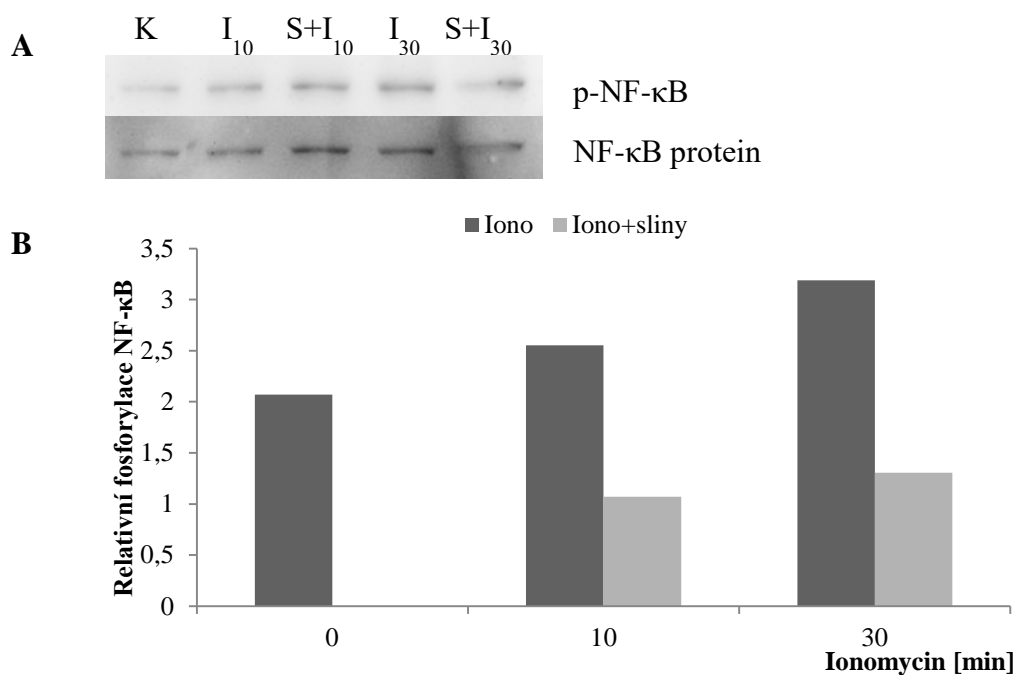


**Obrázek 22:** Vliv klíštěcích slin na aktivitu Akt kinázy v BMMC.

Poslední vybranou signální molekulou je nukleární faktor NF- $\kappa$ B (p65). Výsledky z WB jsou zobrazeny na obrázcích 23 a 24. I zde byla zaznamenána vysoká bazální hladina fosforylovaného NF- $\kappa$ B v obou typech buněk a vliv ionomycinu v desetiminutovém intervalu byl nevýrazný. Třicet minut po stimulaci buněk došlo k lehkému nárůstu aktivity NF- $\kappa$ B v MC/9, v BMMC byl efekt ionomycinu výraznější. U obou typů je také zřetelný inhibiční vliv klíštěcích slin na tuto signální molekulu a to ve všech intervalech. Na grafu 23B je vynesena poměr fosforylované formy NF- $\kappa$ B vůči  $\beta$ -actinu. Na grafu 24B je vynesena poměr p-NF- $\kappa$ B vůči totálnímu proteinu NF- $\kappa$ B.



**Obrázek 23:** Vliv klíštěcích slin na aktivitu NF- $\kappa$ B v MC/9.



**Obrázek 24:** Vliv klíštěcích slin na aktivitu NF- $\kappa$ B v BMSC.

Všechny experimenty, kde byla sledována aktivita signálních molekul pomocí metody Western blotting, byly provedeny nejméně dvakrát.

## 6 Diskuze

Klíště je, stejně jako ostatní parazité, nuceno bránit se imunitní reakci, se kterou se setkává ve chvíli, kdy vsune svůj hypostom do kůže hostitele. Během svého vývoje si proto vyvinulo mnoho mechanismů, kterými je schopné se vypořádat s ataky, které na něho hostitel chystá. Velmi důležitou roli zde hrají klíštěcí sliny. Ty pronikají do kůže, kde ovlivňují mnohé buňky a snaží se překonat obranu hostitele. Žírné buňky, na které se tato práce zaměřuje, osidlují kůži a sliznice a jsou tak mezi prvními buňkami, které přijdou s klíštěcími slinami do styku. MC mají široké spektrum účinků, které zprostředkovávají zejména pomocí mediátorů. Není proto překvapivé, že molekuly, které jsou obsaženy v klíštěcích slinách, ovlivňují právě schopnost žírných buněk produkovat různé bioaktivní látky. Za kontrolou produkce mediátorů a cytokinů ovšem stojí spletité buněčné signální dráhy. Signální molekuly, které jsou do nich zapojeny, jsou proto v tomto kontextu potencionálními cíli právě pro klíšťata, resp. pro látky v jejich slinách, které s nimi interagují a ovlivňují je. Cílem této práce bylo zjistit, zda dochází k ovlivnění produkce vybraných cytokinů klíštěcími slinami, jaké signální molekuly jsou v MC aktivovány ionomycinem a jaké naopak inhibovány slinami a v neposlední řadě navrhnout potencionální mechanismus, kterým klíštěcí sliny ovlivňují produkci cytokinů právě s ohledem na testované signální dráhy.

### 6.1 Ovlivnění produkce cytokinů a chemokinů primárními žírnými buňkami

První část diplomové práce je zaměřena na sledování hladin cytokinů a chemokinů, které produkují žírné buňky s ohledem na ovlivnění produkce klíštěcími slinami. Primární žírné buňky, derivované z kostní dřeně myší, jsou vhodným *in vitro* modelem pro studium základních vlastností MC.

Produkce cytokinů primárními žírnými buňkami zaznamenaná v této práci korespondovala s předchozími studiemi, které se již touto problematikou zabývaly (Galli et al. 1991; Burd et al. 1995; Harvima et al. 1994). Primární žírné buňky po aktivaci produkovaly IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IL-1RA, TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, MCP-1, I-309, MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-2, RANTES a slabý nárůst byl pozorován i u TARC a IL-2. Většina z těchto cytokinů a chemokinů byla také ovlivněna klíštěcími slinami. K signifikantnímu potlačení produkce došlo v případě IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  a ve dvou

případech došlo také k up-regulaci (TARC a MIP-1 $\beta$ ). Při dodatečném testování pomocí ELISA testu bylo dosaženo stejných výsledků v případě IL-3, IL-4, a TNF- $\alpha$ . Vlivem klíštěcích slin na produkci cytokinů žírnými buňkami jsme se již v naší laboratoři zabývali dříve. Koudelková a Langhansová zjistily, že BMMC vykazují sníženou produkci TNF- $\alpha$  a IL-4 v přítomnosti klíštěcích slin (Koudelková 2012; Langhansová et al. 2012). TNF- $\alpha$  je prozánětlivý cytokin a klíčový regulátor zánětlivé reakce (Bradley 2008), zatímco IL-4 indukuje proliferaci a diferenciaci T buněk na Th<sub>2</sub>. Ty mají zásadní vliv na zrání B buněk, čímž výrazně ovlivňují produkci protilátek (Choi & Reiser 1998). Potlačení produkce těchto cytokinů může tedy vést k narušení vzniku zánětu v místě sání a také ke snížení schopnosti hostitele tvořit protilátky. Vliv klíštěcích slin na produkci IL-3 žírnými buňkami doposud zkoumán nebyl. IL-3 (dříve známý jako multi-CSF) přispívá k lokální zánětlivé reakci, má výrazný vliv na krvetvorbu a představuje důležitý růstový faktor pro žírné buňky, které v jeho nepřítomnosti hynou (Frendl 1992). Výsledky, uvedené v této práci tak korespondují s modelem, kdy záměrem klíštěte je potlačit imunitní reakci hostitele.

Inhibiční účinek slin na produkci IFN- $\gamma$  BMMC, který naznačovala data z analýzy supernatantů pomocí cytokinové array, se potvrdit nepodařilo. Ve studii (Kopecký et al. 1999) bylo zjištěno, že extrakt ze slin klíštěte *Ixodes ricinus* inhibuje produkci IFN- $\gamma$  v myších splenocytech. Tento efekt byl pravděpodobně zprostředkován up-regulací IL-10, což byl také výsledek působení klíštěcích slin. Z našich výsledků je patrné, že k up-regulaci IL-10 v BMMC nedošlo. Domnívám se, že z tohoto důvodu pravděpodobně nedošlo ani k výraznému potlačení produkce IFN- $\gamma$ .

Při sledování vlivu klíštěcích slin jsme se zaměřili také na dva chemokiny. Testování makrofágového zánětlivého proteinu MIP-2 ukázalo, že v případě preinkubace BMMC s klíštěcími slinami dochází k potlačení jeho produkce. Slepíčková také testovala vliv SGE (extrakt ze slinných žláz) na produkci tohoto chemokinu. Jako model pro své pokusy zvolila myší makrofágy a i zde zaznamenala inhibiční vliv SGE na MIP-2 (Slepíčková 2007). Tento chemokin je velmi důležitý pro chemotaxi polymorfonukleárních leukocytů a indukuje lokální zánětlivou reakci (Wolpe et al. 1989). Inhibice zmíněného účinku je opět v souladu s modelem, kdy se klíště snaží předejít mechanismům, které mohou jakkoli narušit sání.

MCP-1 neboli monocytární chemotaktický protein, nabírá a aktivuje lymfocyty, makrofágy, paměťové T buňky a bazofilní buňky do místa potřeby (Castellani et al. 2009). Výsledky sledování produkce tohoto chemokinu v této práci původně naznačovaly, že v BMMC dochází vlivem slin ke snížení jeho produkce. Nicméně tento účinek se při dalším testování (ELISA) nepodařilo potvrdit a zdá se, že sliny MCP-1 nijak výrazně neovlivňují. Existují studie, kdy bylo zaznamenáno snížení produkce MCP-1 vlivem slin, ale též zvýšení. Zdá se, že na tuto skutečnost může mít vliv fáze sání, ve které se klíště momentálně nalézá. Hajnická studovala vliv slin tří druhů klíšťat na koncentraci cytokinů a chemokinů. Zjistila, že mezi druhy i cytokiny je poměrně velká variabilita, nicméně hladiny většiny vybraných molekul byly slinami potlačeny (Hajnická et al. 2005). Při testování vlivu slin klíštěte *Ixodes ricinus* na MCP-1 bylo zjištěno, že u samic nedochází k výraznému ovlivnění koncentrace tohoto chemokinu v přítomnosti slin, což koresponduje i s výsledky, které se podařilo získat v mých experimentech. Tento efekt může být pravděpodobně způsoben tím, že anti-cytokinové molekuly obsažené ve slinách se váží přímo na dané cytokiny a chemokiny, čímž brání specifickým protilátkám v přístupu k epitopům. To v konečném důsledku může vést ke snížení detekovatelné hladiny cytokinů stanovené pomocí ELISA testů.

## 6.2 Ovlivnění signálních molekul v žírných buňkách

Tato práce se dále zabývá problematikou signálních drah prostřednictvím sledování aktivity konkrétních signálních molekul. Intracelulární signalizace je velmi komplexní proces, do kterého je zapojena široká škála molekul, kdy každá molekula sleduje svou vlastní kinetiku, některé molekuly mají rychlý nástup, jiné jsou aktivovány pozvolněji. V první řadě proto byla provedena signální array, aby bylo možné zjistit, jaké signální molekuly jsou v MC aktivovány a v jakých časových intervalech a tato data byla poté ověřována pomocí Western blottingu.

Kromě primárních žírných buněk byla k analýze signálních drah využívána i buněčná linie MC/9. Důvodem bylo, kromě obohacení práce o výsledky získané využitím jiného systému i problémy s derivací primárních žírných buněk. V průběhu přípravy diplomové práce jsme byly nuceny změnit dodavatele cytokinů potřebných na derivaci žírných buněk. Přestože byly zakoupeny nové rekombinantní formy těchto cytokinů, nepodařilo se ani po mnoha opakovaných derivacích opět navodit kýžený růst žírných buněk a nebylo možné

s nimi dále pracovat. Domníváme se, že za tímto neúspěchem stojí pravděpodobně špatná jakost dodaných růstových faktorů.

První kinázou, kterou jsme se zabývali, byla ERK1/2 MAP kináza. Tato kináza byla v primárních žírných buňkách i v buněčné linii MC/9 v přítomnosti ionomycinu poměrně silně aktivována. Když se podíváme na vliv klíštěcích slin, není zde příliš patrný jejich účinek na tuto kinázu, ačkoliv signální array naznačovala inhibiční vliv slin, který však nebyl signifikantní. Již dříve byl pozorován inhibiční vliv slin na tuto signální dráhu (Oliveira et al. 2010; Lieskovská & Kopecký 2012). Zmíněné studie však byly prováděny na dendritických buňkách, narážíme zde tedy na odlišný typ buněk, kde může docházet k různým regulacím intracelulárních molekul. Nicméně u obou typů žírných buněk jsem v pozdějších intervalech zaznamenala naopak up-regulační účinek. ERK kináza se účastní tzv. Ras/Raf/Erk signální kaskády, která má zásadní vliv prakticky ve všech funkcích buňky a je proto nutné, aby byla velmi přísně regulována. V závislosti na typu buňky a stimulu může ERK zprostředkovávat různé antiproliferativní funkce, jako například apoptózu (Cagnol & Chambard 2010). Z tohoto důvodu by nemuselo vlivem slin dojít k inhibici této kinázy, ale naopak by pro klíště mohlo být přínosné tuto dráhu up-regulovat za účelem způsobení smrti žírných buněk.

Signální array naznačovala velmi výraznou aktivaci p38 v BMMC a také výrazný inhibiční vliv klíštěcích slin na tuto signální dráhu. Výsledky z WB jsou velmi podobné, aktivita p38 byla slinami potlačena v obou zvolených intervalech. V buněčné linii MC/9 byl vývoj podobný a inhibiční vliv slin byl ve všech intervalech velmi výrazný. Podobně jako ERK1/2 je i p38 zapojena do regulace mnohých buněčných procesů. V žírných buňkách řídí zejména produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Hochdörfer et al. 2013). Jak jsem již zmiňovala, produkce těchto dvou cytokinů byla slinami signifikantně potlačena. Domnívám se proto, že je zde korelace mezi inhibicí této signální dráhy a potlačením produkce cytokinů, a že klíště cílí právě na tuto kinázu ve snaze potlačit produkci prozánětlivých cytokinů, které by narušovaly proces sání. Inhibiční účinek klíštěcích slin na tuto kinázu byl také pozorován již dříve (Oliveira et al. 2010).

Aktivita kinázy Akt měřená fosforylací na Ser473 je v BMMC a stejně tak v MC/9 v případě preinkubace s klíštěcími slinami v pozdějším intervalu od aktivace (30 a 60 minut) výrazně snižena. Existují studie, kde byl potlačující vliv slin na Akt také zaznamenán (Lieskovská & Kopecký 2012; Poole et al. 2009, 2013). Významným cílem

pro Akt je kináza GSK-3, která ve fosforylované formě umožňuje syntézu glykogenu a tím podporuje růst buňky (Cross et al. 1995). Mimoto je také pozitivním regulátorem zánětu (Martin et al. 2005). GSK-3 byla podle dat z arraye v BMMC silně aktivována a klíštěcí sliny na ni měly signifikantní inhibiční účinek. Potlačení její fosforylace vede k obnovení inhibičního účinku GSK-3 a následně ke smrti buněk. Lze tedy předpokládat, že prostřednictvím inhibice Akt respektive GSK-3 pravděpodobně může docházet k potlačení rozvoje zánětu a též k buněčné smrti. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že Akt potlačuje umírání buněk také prostřednictvím inhibice pro-apoptického proteinu Bad (Datta et al. 1997, 2002). Tento protein v de-fosforylované formě vykazuje pro-apoptické účinky. V případě potlačení aktivace signální dráhy Akt, která Bad fosforyluje, může dojít k vymizení jejího vlivu na Bad a následně opět ke smrti buněk, v důsledku působení tohoto pro-apoptického proteinu. Fosforylace proteinu Bad byla v BMMC vlivem klíštěcích slin také slabě inhibována, avšak tento vliv nebyl signifikantní a nebyl dále testován. Je proto ještě potřeba potvrdit tyto hypotézy dodatečnými experimenty zaměřenými na apoptózu MC.

Nukleární faktor NF- $\kappa$ B (p65) byl poslední sledovanou molekulou. Tato molekula není zahrnuta v signální array, předpokládali jsme však, že klíštěcí sliny budou aktivitu této molekuly také potlačovat, jelikož potlačující účinek slin na dráhu NF- $\kappa$ B byl v naší laboratoři již pozorován (Lieskovská et al. 2015). Je známo, že tento faktor je důležitý pro regulaci a řízení rozvoje zánětu, prostřednictvím stimulace či inhibice různých transkripčních faktorů. Spolu s p38 se podílí na řízení produkce cytokinů, zejména IL-6 a TNF- $\alpha$  (Shimura et al. 2012; Zuckerman et al. 1991). Jedná se o velmi důležité cytokiny, které napomáhají správnému rozvoji imunitní odpovědi. Již výše jsem zmiňovala, že v BMMC bylo zaznamenáno signifikantní potlačení obou cytokinů klíštěcími slinami a nastínila jsem zde korelaci mezi tímto účinkem a potlačením dráhy p38. Při testování aktivity NF- $\kappa$ B pomocí WB byl zaznamenán inhibiční účinek slin na aktivitu této molekuly. Předpokládám proto, že produkce zmíněných cytokinů, a pravděpodobně i některých dalších, je v žírných buňkách potlačena právě prostřednictvím inhibičního účinku na signální dráhy p38 MAP kinázy a NF- $\kappa$ B.

Získané výsledky nám tak poskytují jistý náhled do komplexnosti a řízení těchto drah a také do jejich ovlivnění klíštětem při napadení hostitele.



## 7 Závěr

1. Klíštěcí sliny vykazují inhibiční efekt na produkci IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  a MIP-2 primárními žírnými buňkami.
2. V primárních žírných buňkách i v buněčné linii MC/9 dochází vlivem ionomycinu k aktivaci ERK 1/2 MAP kinázy, p38 MAP kinázy a Akt. V primární kultuře žírných buněk byla navíc detekována zvýšená aktivita NF- $\kappa$ B.
3. Klíštěcí sliny vykazují inhibiční účinek na signální dráhu p38 MAP kinázy a NF- $\kappa$ B jak v primárních žírných buňkách, tak v buněčné linii MC/9. Důsledkem inhibice těchto signálních drah může být ovlivněna produkce některých cytokinů v přítomnosti klíštěcích slin. Výrazně byla slinami potlačena i fosforylace Akt kinázy.

## 8 Seznam zkratek

AMPK - adenosine monophosphate-activated protein kinase

AP – activator protein

ATF – activating transcription factor

Bad – Bcl-2-associated death promoter

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

BIM<sub>EL</sub> – Bcl-2-interacting mediator of cell death extra long

BLC – B-lymphocyte chemoattractant

BMMC – bone marrow mast cells, žírné buňky izolované z kostní dřevě

BOFES – bovinní fetální sérum

C5 – komplementová komponenta

CD – cluster of differentiation

CREB – cAMP response element-binding protein

CSF – kolonie stimulující faktor

DC – dendritic cell, dendritická buňka

EGF – epidermal growth factor, epidermální růstový faktor

ELAM – endothelial leukocyte adhesion molecule

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

Elk – ETS domain-containing protein

Eotaxin – eosinophil chemotactic protein

ERK – extracellular signal-regulated kinases

ETS – E26 transformation-specific

FcR – Fc receptor

GSK-3 – glycogen synthase kinase-3

HSP27 – heat shock protein 27

ICAM – intercellular adhesion molecule

IFN – interferon

IL – interleukin

IL-1ra – antagonist IL-1 receptoru

IMDM – Iscove's modified Dulbecco's medium

I-TAC – interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant

IκB – inhibitor κB

JNK – c-Jun N-terminal kinase

KC – keratinocyte chemoattractant  
LPS – lipopolysacharid  
LTB4 – leukotrien B4  
MAdCAM – mucosal vascular addressin cell adhesion molecule  
MAP – mitogen-activated protein kinase, mitogenem aktivovaná proteinkináza  
MC – mast cell, žírná buňka  
MCP – monocyte chemoattractant protein, monocytární chemotaktický protein  
MEK – mitogen-activated protein kinase kinase  
MHC – major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex  
MIG – monokine induced by interferon-gamma  
MIP – macrophage inflammatory protein, makrofágový zánětlivý protein  
mTOR – mechanistic target of rapamycin  
NF-AT – nuclear factor of activated T-cells  
NF- $\kappa$ B – nukleární faktor kappa B  
NK – natural killers, přirozený zabíječ  
PARP – poly ADP ribose polymerase  
PGE2 – prostaglandin E2  
PH – pleckstrin homologní  
PI3K – phosphatidylinositide 3-kinase  
PRAS40 – proline-rich Akt substrate of 40 kDa  
RANTES - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted  
Sap-1 – switch-activating protein  
SAPK – stress-activated protein kinase  
SCF – stem cell factor, faktor kmenových buněk  
SCFR – stem cell factor receptor, receptor pro faktor kmenových buněk  
SDF-1 – stromal cell-derived factor 1  
STAT – signal transducer and activator of transcription  
TARC – thymus and activation regulated chemokine  
TCF – ternary complex factor  
TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases  
TLR – Toll-like receptor  
TNF – tumor necrosis factor  
TREM – triggering receptor expressed on myeloid cells  
VCAM – vascular cell adhesion molecule

## 9 Seznam použité literatury

**Abonia JP, Austen KF, Rollins BJ, Joshi SK, Flavell RA, Kuziel WA, Koni PA, Gurish MF** (2005) Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood* 105(11):4308-4313.

**Abonia JP, Hallgren J, Jones T, Shi T, Xu Y, Koni P, Flavell RA, Boyce JA, Austen KF, Gurish MF** (2006) Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood* 108(5):1588–1594.

**Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, Bronson R, Beg AA, Scott M, Doerschuk CM, Hynes RO, Baltimore D** (2001) Targeted mutation of TNF receptor I rescues the ReIA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology* 167(3):1592-600.

**Aldenborg F, Enerbäck L** (1985) Thymus dependence of connective tissue mast cells: a quantitative cytofluorometric study of the growth of peritoneal mast cells in normal and athymic rats. *International Archives of Allergy and Immunology* 78(3):277-282.

**Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA** (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15(23):6541–6551.

**Anderson J, Magnarelli L** (2008) Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America* 22(2):195-215.

**Andjelković M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA** (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12):5699-704.

**Anguita J, Barthold SW, Persinski R, Hedrick MN, Huy CA, Davis RJ, Flavell RA, Fikrig E** (2002a) Murine Lyme arthritis development mediated by p38 mitogen-activated protein kinase activity. *The Journal of Immunology* 168(12):6352–7.

**Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase PW, Rincón M, Kantor FS, Fikrig E (2002b)** Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16 (6):849-859.

**Anisuzzaman, Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anas MA, Hasan MM, Matsumoto Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Fujisaki K, Tsuji N (2014)** Longistatin in tick saliva blocks advanced glycation end-product receptor activation. *The Journal of clinical investigation* 124(10):4429-44.

**Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997)** Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of cell science* 110:369-378.

**Badger AM, Cook MN, Lark MW, Newman-Tarr TM, Swift BA, Nelson AH, Barone FC, Kumar S (1998)** SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *The Journal of Immunology* 161(1):467-73.

**Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998)** Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology* 8:1049–1057.

**Betz M, Fox B (1991)** Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *The Journal of Immunology* 146:108-113.

**Binnington KC, Kemp DH (1980)** Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Advances in parasitology* 18:315-39.

**Bloom GD (1984)** A short history of the mast cell. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum* 414:87–92.

**Bonizzi G, Karin M (2004)** The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25(6):280-8.

**Borish L, Joseph BZ (1992)** Inflammation and the allergic response. *The Medical clinics of North America* 76(4):765-87.

**Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991)** ERKs: a family of

protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65(4):663-75.

**Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH** (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249(4964):64-7.

**Bowman AS, Coons LB, Needham GR, Sauer JR** (1997) Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and veterinary entomology* 11(3):277-85.

**Bradford MM** (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.

**Bradley J** (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology* 214(2):149-160.

**Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J** (2009) Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *Journal of neurochemistry* 108(6):1323-35.

**Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ** (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development* 17:1969-1978.

**Brewster J, de Valoir T, Dwyer N, Winter E, Gustin M** (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259(5102):1760-1763.

**Brossard M, Fivaz V** (1982) *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology* 85(3):583-92.

**Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC** (1995) Activated mast cells produce interleukin 13. *The Journal of experimental medicine* 181(4):1373-80.

**Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP** (1982) Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216(4552):1317-9.

- Cagnol S, Chambard J** (2010) ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* 277(1):2-21.
- Cai B, Chang S, Becker E, Bonni A, Xia Z** (2006) p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of Bim<sub>EL</sub> at Ser-65. *The Journal of biological chemistry* 281(35):25215-25222.
- Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings BA, Downward J, Parker PJ, Larijani B** (2007) Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS biology* 5(4):e95.
- Castellani ML, Vecchiet J, Salini V, Conti P, Theoharides TC, Caraffa A, Antinolfi P, Teté S, Ciampoli C, Cuccurullo C, Cerulli G, Felaco M, Boscolo P** (2009) Stimulation of CCL2 (MCP-1) and CCL2 mRNA by substance P in LAD2 human mast cells. *Translational Research* 154:27–33.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N** (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* 15(17):2203–2208.
- Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM** (2009) Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nature reviews. Drug discovery* 8:892-909.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ** (2001b) Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB $\beta$ ). *Science* 292(5522):1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ** (2001a) Akt1/PKB alpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276(42):38349-38352.
- Choi P, Reiser H** (1998) IL-4: role in disease and regulation of production. *Clinical and experimental immunology* 113(3):317-9.
- Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ** (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regulation* 2(12):965–978.

**Cockcroft S, Gomperts BD** (1979) ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279(5713):541-542.

**Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA** (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *The Journal of Immunology* 161(7):3225-36.

**Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA** (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378(6559):785-9.

**Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E** (2010) Tick histamine release factor is critical for Ixodes scapularis engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathogenes* 6(11):e1001205.

**Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME** (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-241.

**Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME** (2002) Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Developmental cell* 3(5):631-43.

**Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR** (2002) The lymphotoxin- $\beta$  receptor induces different patterns of gene expression via two NF- $\kappa$ B pathways. *Immunity* 17:525–535.

**Déruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, Ferreira BR, Graham GJ, Shaw JP, Wells TN, Teixeira MM, Power CA, Proudfoot AE** (2008) Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *The Journal of experimental medicine* 205(9):2019-31.

**Drew E, Merkens H, Chelliah S, Doyonnas R, McNagny K** (2002) CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Experimental hematology* 30(10):1211-8.

**Ehrlich P** (1877) Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv fuer mikroskopische Anatomie* 13:263-278.



**Ehrlich P** (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis, Leipzig University.

**Enerbäck L, Lundin PM** (1974) Ultrastructure of mucosal mast cells in normal and compound 48/80-treated rats. *Cell and Tissue Research* 150(1): 95-105.

**Enslin H, Brancho DM, Davis RJ** (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *The EMBO journal* 19(6):1301-1311.

**Fox CC, Jewell SD, Whitacre CC** (1994) Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line. *Cellular immunology* 158(1):253-264.

**Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM** (2009) The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience* 14:2051-88.

**Frendl G** (1992) Interleukin 3: from colony-stimulating factor to pluripotent immunoregulatory cytokine. *International journal of immunopharmacology* 14(3):421-30.

**Frödin M, Gammeltoft S** (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 151(1-2):65-77.

**Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S** (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nature immunology* 3(9):875-81.

**Galli S, Gordon J, Wershil B** (1991) Cytokine production by mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology* 3(6):865-873.

**Galli S, Grimbaldston M, Tsai M** (2008) Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of innate and acquired immunity. *Nature reviews. Immunology* 8(6):478-86.

**Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneux C, Pezeron G, Porteu F** (2002) IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *The EMBO journal* 21(19):5151-63.

**Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG** (2003) Severe diabetes, age-

dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* 112(2):197-208.

**Garrington TP, Ishizuka T, Papst PJ, Chayama K, Webb S, Yujiri T, Sun W, Sather S, Russell DM, Gibson SB, Keller G, Gelfand EW, Johnson GL** (2000) MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells. *The EMBO journal* 19(20):5387-5395.

**Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ** (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 266(3):22159-22163.

**Gurish M, Austen K** (2001) The diverse roles of mast cells. *The Journal of experimental medicine* 194(1):f1–f6.

**Hajnická V, Vancová I, Kocáková P, Slovák M, Gasperík J, Sláviková M, Hails RS, Labuda M, Nuttall PA** (2005) Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130(Pt 3):333-42.

**Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA Jr.** (1983) Inhibition by prostaglandins of leukotriene B<sub>4</sub> release from activated neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4349-4353.

**Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ** (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173):808-11.

**Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ** (1993) Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *The Journal of biological chemistry* 268(33):25009-14.

**Harvima IT, Horsmanheimo L, Naukkarinen A, Horsmanheimo M** (1994) Mast cell proteinases and cytokines in skin inflammation. *Archives of Dermatological Research* 287:61-67.

**Hayden MS, West AP, Ghosh S** (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25:6758–6780.

- Heidenreich KA, Kummer JL** (1996) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. *The Journal of biological chemistry* 271(17):9891-4.
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM** (2011) Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* 23(10):1515-27.
- Hill MM, Hemmings BA** (2002) Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* 93(2-3):243-51.
- Hochdörfer T, Tiedje C, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Gaestel M, Huber M** (2013) LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in mast cells is dependent on p38 but independent of TTP. *Cellular signalling* 25(6):1339-1347.
- Horigome K, Bullock ED, Johnson EM** (1994) Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *The Journal of biological chemistry* 269(4):2695-702.
- Hourcade DE, Akk AM, Mitchell LM, Zhou HF, Hauhart R, Pham CT** (2016) Anti-complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Molecular Immunology* 69:62-69.
- Iemura A, Tsai M, Ando A, Wershil B, Galli S** (1994) The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *The American journal of pathology* 144(2):321-328.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL** (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4(9):648-57.
- Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB** (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(12): 4464-4468.
- Ishizaka K, Ishizaka T** (1967) Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *The Journal of Immunology* 99(6):1187-1198.
- Ishizaka K, Ishizaka T** (1971) IgE and reaginic hypersensitivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 190(1):443-456.

**Ishizaka T, Mitsui H, Yanagida M, Miura T, Dvorak A** (1993) Development of human mast cells from their progenitors. *Current Opinion in Immunology* 5(6):937-943.

**Ishizuka T, Chayama K, Takeda K, Hamelmann E, Terada N, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW** (1999) Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. *The Journal of Immunology* 162(4):2087-2094.

**Ishizuka T, Kawasome H, Terada N, Takeda K, Gerwins P, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW** (1998) Stem cell factor augments FcεRI-mediated TNF-α production and stimulates MAP kinases via a different pathway in MC/9 mast cells. *The Journal of Immunology* 161:3624-3630.

**Iwanaga S, Okada M, Isawa H, Morita A, Yuda M, Chinzei Y** (2003) Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *European journal of biochemistry* 270(9):1926-34.

**Janknecht R, Ernst W, Pingoud V, Nordheim A** (1993) Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *The EMBO Journal* 12(13):5097-104.

**Janknecht R, Hunter T** (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *The EMBO Journal* 16:1620-1627.

**Jost PJ, Ruland J** (2007) Aberrant NF-κB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109(7):2700-2707.

**Kambayashi T, Baranski JD, Baker RG, Zou T, Allenspach EJ, Shoag JE, Jones PL, Koretzky GA** (2008) Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation. *Blood* 111(3):1489-96.

**Kamide Y, Ishizuka T, Tobo M, Tsurumaki H, Aoki H, Mogi C, Nakakura T, Yatomi M, Ono A, Koga Y, Sato K, Hisada T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F** (2015) Acidic environment augments FcεRI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells. *Biochemical and biophysical research communications* 464(3):949-55.

**Kasakura K, Takahashi K, Itoh T, Hosono A, Nunomura S, Ra C, Momose Y, Itoh K, Nishiyama C, Kaminogawa S** (2014) C/EBP $\alpha$  controls mast cell function. *FEBS Letters* 588(24):4645-53.

**Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV** (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology* 21(3):893-901.

**Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD** (1992) The effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of mast cells and basophils from CD34 pluripotent progenitor cells. *The Journal of Immunology* 148:772-777.

**Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Scott LM, Metcalfe DD** (1999) Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 94(7):2333-2342.

**Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD** (1991) Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *The Journal of Immunology* 146(5):1410-5.

**Kitamura Y** (1989) Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change Between Subpopulations. *Annual Review of Immunology* 7(1):59-76.

**Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T** (1987) Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *International archives of allergy and applied immunology* 82(3-4):244-8.

**Kitaura J, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Kikkawa U, Kawakami T** (2000) Akt-Dependent Cytokine Production in Mast Cells. *The Journal of experimental medicine* 192(5):729-40.

**Klemm S, Gutermuth J, Hültner L, Sparwasser T, Behrendt H, Peschel C, Mak TW, Jakob T, Ruland J** (2006) The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc $\epsilon$ RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *The Journal of experimental medicine* 203:337-347.

- Kopecký J, Kuthejlová M, Pechová J** (1999) Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite immunology* 21(7):351-6.
- Koudelková Š.** The utilisation of mast cells for exploration of immunomodulatory effects of tick salivary proteins. České Budějovice, 2012. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.
- Kramer C, Nahmias Z, Norman DD, Mulvihill TA, Coons LB, Cole JA** (2008) *Dermacentor variabilis*: Regulation of fibroblast migration by tick salivary gland extract and saliva. *Experimental Parasitology* 119(3):391–397.
- Krause D, Deutsch C** (1991) Cyclic AMP directly inhibits IL-2 receptor expression in human T cells: expression of both p55 and p75 subunits is affected. *The Journal of Immunology* 146(7):2285-96.
- Kubes M, Fuchsberger N, Labuda M, Zuffová E, Nuttall P** (1994) Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. *Immunology* 82:113–116.
- Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC** (1999) Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 263(3):825-31.
- Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA** (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(33):20490-4.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Langhansová H, Klein M, Schmitt E, Kopecký J** (2012) P1676: Mast cells are a target of tick saliva. *Immunology* 137:697-697.
- Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ** (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90–93.

**Lawrence T** (2009) The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(6):a001651.

**Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW** (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372(6508):739-46.

**Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P** (2008) Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and cellular biology* 28(1):511-527.

**Lieskovská J, Kopecký J** (2012) Effect of tick saliva on signalling pathways activated by TLR-2 ligand and *Borrelia afzelii* in dendritic cells. *Parasite immunology* 34(8-9):421-9.

**Lieskovská J, Páleníková J, Langhansová H, Campos Chagas A, Calvo E, Kotsyfakis M, Kopecký J** (2015) Tick sialostatins L and L2 differentially influence dendritic cell responses to *Borrelia* spirochetes. *Parasites & vectors* 8:275.

**Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ** (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72(2):269-78.

**Martin M, Rehani K, Jope R, Michalek S** (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology* 6(8):777-84.

**Matsuoka T, Yashiro M** (2014) The Role of PI3K/Akt/mTOR Signaling in Gastric Carcinoma. *Cancers* 6(3):1441–1463.

**Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, Kovanen P, Piliponsky AM, Kambe N, Vliagoftis H, Levi-Schaffer F, Metz M, Miyachi Y, Befus D, Forsythe P, Kitamura Y, Galli S** (2003) What is the physiological function of mast cells? *Experimental dermatology* 12(6):886-910.

**Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ** (2004) Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 432(7016):512-6.

**Mekori Y, Metcalfe D** (1999) Mast cell-T cell interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 104(3):517-523.

- Metcalf D, Baram D, Mekori Y** (1997) Mast cells. *Physiological Reviews* 77(4):1033-1079.
- Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammell V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ** (2006) Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* 313(5786):526-30.
- Metzger H, Alcaraz G, Hohman R, Kinet JP, Pribluda V, Quarto R** (1986) The Receptor with High Affinity for Immunoglobulin E. *Annual Review of Immunology* 4 (1):419-470.
- Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet J** (1989) Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science* 244:334-337.
- Montagut C, Settleman J** (2009) Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Letters* 283(2):125-34.
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD** (2010) Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunology* 3(2):111-128.
- Mulenga A, Azad AF** (2005) The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Experimental & applied acarology* 37:215–229.
- Muñoz S, Hernández-Pando R, Abraham S, Enciso J** (2003) Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *The Journal of Immunology* 170:5590–5596.
- Murphy LO, Blenis J** (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences* 31(5):268-75.
- Muslin AJ** (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clinical Science* 115:203–218.
- Mysterud A, Byrkjeland R, Qviller L, Viljugrein H** (2015) The generalist tick *Ixodes ricinus* and the specialist tick *Ixodes trianguliceps* on shrews and rodents in a northern forest ecosystem—a role of body size even among small hosts. *Parasites & vectors* 8:639.



- Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA** (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of biological chemistry* 274(31):21528-32.
- Needham GR** (1985) Evaluation of five popular methods of tick removal. *Pediatrics* 75:997–1002.
- Needham GR, Teel PD** (1991) Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual review of entomology* 36:659-81.
- Ng MF** (2010) The role of mast cells in wound healing. *International wound journal* 7(1):55-61.
- Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, Okayama Y** (2003) Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and Fc epsilon RI. *Blood* 102(7):2547-54.
- Oliveira CJ, Carvalho WA, Garcia GR, Gutierrez FR, de Miranda Santos IK, Silva JS, Ferreira BR** (2010) Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. *Veterinary parasitology* 167(2-4):288-97.
- Oliveira CJ, Sá-Nunes A, Francischetti IM, Carregaro V, Anatriello E, Silva JS, Santos IK, Ribeiro JM, Ferreira BR** (2011) Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *The Journal of biological chemistry* 286(13):10960-10969.
- Ono K, Han J** (200) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signalling* 12(1):1-13.
- Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI** (1999) Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular cell* 3(5):661-71.
- Parola P, Raoult D.** (2001) Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases* 32:897–928.
- Pechová J, Kopecký J, Salát J** (2004) Effect of tick salivary gland extract on the cytokine production by mouse epidermal cells. *Folia parasitologica* 51(4):367-72.

- Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, de Jong N, Lee JC, Koster JF, Sluiter W** (1997) p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochemical and biophysical research communications* 230(1):44-8.
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R** (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:1619–1633.
- Poole N, Coons L, Cole J** (2009) *Dermacentor variabilis*: Tick saliva inhibits osteosarcoma (Saos) cell migration and invasion. *The FASEB Journal* 23(1):687-2.
- Poole N, Nyindodo-Ogari L, Kramer C, Coons L, Cole J** (2013) Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Ticks and Tick-borne Diseases* 4(1):120-127.
- Preston SG, Majtán J, Kouremenou C, Rysnik O, Burger LF, Cabezas Cruz A, Chiong Guzman M, Nunn MA, Paesen GC, Nuttall PA, Austyn JM** (2013) Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS pathogens* 9(6):e1003450.
- Price M, Cruzalegui F, Treisman R** (1996) The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *The EMBO Journal* 15(23):6552–6563.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ** (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* 270(13):7420-6.
- 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(5):818-826.
- Ramachandra RN, Wikel SK** (1995) Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *Journal of Medical Entomology* 32(3):338-45.

- Raman M, Chen W, Cobb MH** (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100–3112.
- Randolph SE** (2010) To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? *Veterinary parasitology* 167(2-4):92-4.
- Ribeiro JM** (1987) *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental parasitology* 64:347–353.
- Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A** (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of experimental medicine* 161:332–344.
- Ribeiro JM, Makoul GT, Robinson DR** (1988) *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *The Journal of parasitology* 74(6):1068-9.
- Ribeiro JM, Weis JJ, Telford SR 3<sup>rd</sup>**. (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology* 70(4):382–388.
- Roskoski R** (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* 66(2):105-43.
- Roux PP, Blenis J** (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* 68(2):320-44.
- Schoeler GB, Manweiler SA, Wikel SK** (1999) *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Experimental parasitology* 92:239-248.
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M** (2001a) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293(5534):1495-9.
- Senftleben U, Li ZW, Baud V, Karin M** (2001b) IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* 14(3):217-230.
- Sharrocks AD** (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(11):827-37.

**Shimura M, Yamamoto M, Fujii G, Takahashi M, Komiya M, Noma N, Tanuma S, Yanaka A, Mutoh M** (2012) Novel Compound SK-1009 Suppresses Interleukin-6 Expression through Modulation of Activation of Nuclear Factor-KappaB Pathway. *Biological & pharmaceutical bulletin* 35(12):2186-91.

**Shin OS, Miller LS, Modlin RL, Akira S, Uematsu S, Hu LT** (2009) Downstream signals for MyD88-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* can be initiated by TRIF and are dependent on PI3K. *The Journal of Immunology* 183(1):491-8.

**Shiozaki K, Russell P** (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378:739–743.

**Silberstein R, Melnick M, Greenberg G, Minkin C** (1991) Bone remodeling in W/W<sup>v</sup> mast cell deficient mice. *Bone* 12(4):227-36.

**Slepičková E.** Vliv klíčících slin na produkci cytokinu MIP–2 myšími makrofágy. České Budějovice, 2007. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita. Biologická fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

**Sonenshine DE** (1991) *Biology of Ticks*. Svazek 1. New York: Oxford University Press.

**Stassen M, Valeva A, Walev I, Schmitt E** (2006) Activation of mast cells by streptolysin O and lipopolysaccharide. *Methods in molecular biology* 315:393-403.

**Tanti JF, Jager J** (2009) Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology* 9(6):753-62.

**Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM** (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of experimental medicine* 173(2): 507–510.

**Tilden AB, Balch CM** (1982) A comparison of PGE 2 effects on human suppressor cell function and on interleukin 2 function. *The Journal of Immunology* 129(6):2469-73.

**Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser MR, Hagaman DD, Gilfillan AM, Metcalfe DD** (2002) Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Molecular immunology* 38(16-18):1289-93.

**Urb M, Sheppard D** (2012) The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS pathogens* 8(4):e1002619.

**Ushio H, Watanabe N, Kiso Y, Higuchi S, Matsuda H** (1993) Protective immunity and mast cell and eosinophil responses in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Parasite immunology* 15(4):209-14.

**Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M** (2003) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *European journal of immunology* 33(4):899-906.

**Vlasuk GP** (1993) Structural and functional characterization of tick anticoagulant peptide (TAP): a potent and selective inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Thrombosis and haemostasis* 70(1):212-6.

**von Ruedorffer U, Fisch R, Peel J, Roosje P, Griot-Wenk M, Welle M** (2003) Flea bite hypersensitivity: New aspects on the involvement of mast cells. *Veterinary journal* 165(2):149-56.

**Wang H, Nuttall PA** (1995) Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. *Parasitology* 111(Pt 2):161-165.

**Waskiewicz AJ, Cooper JA** (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Current opinion in cell biology* 7(6):798-805.

**Weidner N, Austen KF** (1993) Heterogeneity of Mast Cells at Multiple Body Sites: Fluorescent Determination of Avidin Binding and Immunofluorescent Determination of Chymase, Tryptase, and Carboxypeptidase Content. *Pathology - Research and Practice* 189(2):156-162.

**Wolpe S, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt R, Cerami A** (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(2):612-6.

**Xue L, Gyles SL, Wetthey FR, Gazi L, Townsend E, Hunter MG, Pettipher R** (2005) Prostaglandin D<sub>2</sub> causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine

production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *The Journal of Immunology* 175(10):6531-6536.

**Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ** (1997) Production of macrophage inflammatory protein-1 alpha by human mast cells: Increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 77(2):185-93.

**Yoon S, Seger R** (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* 24(1):21-44.

**Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC** (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *The Journal of biological chemistry* 272(18):12116-12121.

**Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M** (1997) The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91:243–252.

**Zorn CN, Keck S, Hendriks RW, Leitges M, Freudenberg MA, Huber M** (2009) Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cellular Signalling* 21(1):79-86.

**Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA, Langley KE** (1990) Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 63:195-201.

**Zuckerman S, Evans G, Guthrie L** (1991) Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology* 73(4):460-5.

**Zúñiga A, Torres J, Ubeda J, Pulido R** (1999) Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides

substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 274:21900–21907