

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Úloha osy PD-1/PD-L1
při infekci *Borrelia burgdorferi* u myši

Bakalářská práce

Anna Palounková

Školitel: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Palounková A., 2022: Úloha osy PD-1/PD-L1 při infekci *Borrelia burgdorferi* u myši. [The role of PD-1/PD-L1 axis during *Borrelia burgdorferi* infection in mice. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Borrelia burgdorferi, the causative agent of Lyme disease, induces upregulation of inhibitory immune checkpoint PD-L1 in mice. We studied if the blockade of PD-1/PD-L1 axis by neutralizing antibodies influences the proliferation of T lymphocytes and cytokine milieu in immunological synapsis between murine dendritic cells and T cells *in vitro*.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 13.4.2022

.....

Anna Palounková

Poděkování:

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

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

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 1.1 | Rod <i>Borrelia</i> | 1 |
| 1.2 | Klinika lymeské boreliózy | 1 |
| 1.3 | Imunitní odpověď při infekci bakteriemi rodu <i>Borrelia</i> | 2 |
| 1.4 | Únikové mechanismy imunitnímu systému | 4 |
| 1.4.1 | Rezistence <i>B. burgdorferi</i> vůči komplementu..... | 4 |
| 1.4.2 | Flexibilní adaptivní genom a antigenní variabilita <i>B. burgdorferi</i> | 5 |
| 1.4.3 | Klíštěcí sliny..... | 5 |
| 1.4.4 | Adheziny <i>B. burgdorferi</i> | 6 |
| 1.5 | Inhibiční kontrolní body imunitního systému | 6 |
| 1.5.1 | Mechanismus působení kontrolních bodů CTLA-4 a PD-1 | 6 |
| 1.5.2 | Inhibiční dráha PD-1/PD-L1 | 7 |
| 1.5.3 | Imunitní kontrolní body u rakoviny | 8 |
| 1.5.4 | Kontrolní body u chronických infekcí..... | 8 |
| 2 | Cíle práce | 10 |
| 3 | Materiál a metody..... | 11 |
| 3.1 | Laboratorní myši | 11 |
| 3.2 | Borelie | 11 |
| 3.3 | Izolace kostní dřeně a derivace plazmacytoidních dendritických buněk (pDC) | 12 |
| 3.4 | Aktivace pDC boreliemi a ošetření anti-PD-L1 protilátkou..... | 13 |
| 3.5 | Infekce myši a izolace splenocytů..... | 14 |
| 3.6 | Barvení pomocí CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit..... | 14 |
| 3.7 | Měření na průtokovém cytometru | 15 |
| 3.8 | Cytokinová ELISA | 15 |
| 3.8.1 | Stanovení TGF- β | 16 |
| 3.8.2 | Stanovení IL-2 a IL-10..... | 16 |
| 3.9 | Magnetická separace neutrofilů pomocí kitu MACS Miltenyi biotec..... | 17 |
| 3.10 | Statistická analýza | 18 |
| 4 | Výsledky | 19 |
| 4.1 | Indukce PD-L1 boreliemi..... | 19 |
| 4.2 | Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci T lymfocytů..... | 21 |
| 4.3 | Produkce cytokinů..... | 26 |
| 5 | Diskuze..... | 29 |
| 6 | Shrnutí | 33 |
| 7 | Seznam použité literatury | 34 |
| 8 | Použité zkratky | 40 |

1 Úvod

1.1 Rod *Borrelia*

Bakterie rodu *Borrelia* řadíme do řádu Spirochaetales, třídy Spirochaetes a kmene Spirochaetae. Spirochéty rodu *Borrelia* byly pojmenovány po francouzském biologovi Amédeu Borrelovi a poprvé byly popsány Swellengrebelem roku 1907 (Margos et al., 2018). Druhový komplex se v současnosti skládá z 22 potvrzených druhů *Borrelia*, z nichž několik může způsobit lymeskou boreliózu u lidí (Majerová et al., 2020). Jednotlivé druhy borelií se liší svou geografickou distribucí, hostitelskou specifitou a schopností způsobit onemocnění u lidí. Klinicky různé patogenní druhy borelií jsou spojeny s různými symptomy onemocnění, které lze pozorovat v pozdních stádiích lymeské boreliózy. Například *Borrelia afzelii* je nejčastěji spojována s kožními projevy, *Borelia garinii* a *Borrelia bavariensis* s neuroboreliózou a *B. burgdorferi* s artritickými symptomy. Hlavní vektory přenášející rod *Borrelia* jsou klíšťata patřící do rodu *Ixodes*. Pro tyto vektory bylo identifikováno více než 100 druhů obratlovců, kteří mohou být hostiteli pro spirochéty lymeské boreliózy (Margos et al., 2011).

1.2 Klinika lymeské boreliózy

Lymeská borelióza je v současnosti považována za nejrozšířenější infekci přenášenou vektory v USA, částech Asie a Evropy. Borelie přežívají ve složitém cyklu zahrnující klíštěcí přenašeče a řadu savčích hostitelů. Když infikovaná klíšťata sají na hostiteli, spirochéty opouštějí střevo, migrují do slinných žláz klíštěte a spolu se slinami se přenášejí do dermis hostitele. Z dermis se borelie šíří do mnoha vnitřních orgánů včetně kloubů, srdce a nervového systému (Kung et al., 2013).

První popis klinických projevů lymeské boreliózy provedl Buchwald v roce 1883, kdy popsal atrofické kožní léze a označil je jako difúzní idiopatické kožní atrofie (Cardenas-de la Garza et al., 2019). Klinický konsenzus v současné době rozděluje lymeskou boreliózu na akutní lokalizovanou (erythema migrans) a diseminovanou fázi, která se dělí na časnou a pozdní fázi. Neurologické poruchy se mohou objevit kdykoliv v rámci diseminovaného stádia a může být postižen jak centrální, tak periferní nervový systém (Garcia-Monco & Benach, 2019).

Nejčastějším projevem lymeské boreliózy je prstencovitá, začervenalá kožní vyrážka zvaná erythema migrans (EM), která je zapříčiněna lokalizovanou infekcí v místě kousnutí klíštěte

po inkubační době v rozmezí 3 až 32 dnů. Ve Spojených státech má mnoho pacientů s EM další symptomy jako je únava, artralgie, myalgie a bolest hlavy. Během prvních dnů infekce může být přítomna také horečka a zimnice, zejména u dětí. S EM může být někdy spojena i lymfopenie a zvýšené hladiny jaterních enzymů (Branda & Steere, 2021).

Během časně diseminované infekce se u pacientů může vyvinout akutní lymeská neuroborelióza. Mezi nejběžnější příznaky neuroboreliózy patří lymfocytární meningitida s bolestmi hlavy nebo Bannwarthův syndrom. (Steere et al., 2016). Pacienti s Bannwarthovým syndromem mají obvykle segmentální bolesti podobné pásovému oparu a u 75 % pacientů se během 1–4 týdnů rozvine neurologický deficit. Deficit hlavových nervů se vyskytuje zhruba u 60 % pacientů s Bannwarthovým syndromem a ve více než 80 % takových případů vede k postižení lícního nervu a obličejové obrně (Rauer et al., 2018). I bez antibiotické léčby se akutní lymeská neuroborelióza obvykle zlepši nebo odezní během měsíců. Při časně diseminované infekci mohou nastat i akutní srdeční problémy, které se většinou projevují přerušáním elektrických impulzů ze síní do komor (Steere et al., 2016).

Projevy pozdního stádia lymeské boreliózy může být artritida, která se častěji objevuje u pacientů ve Spojených státech než v Evropě. V Evropě je častější projev acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) (Steere et al., 2016). ACA je pozdní chronický projev boreliózy, který je charakterizován kožní atrofií a postihuje převážně distální části končetin. Na rozdíl od jiných kožních projevů lymeské boreliózy se ACA samovolně nevyléčí. Neléčená může přejít od červenomodrého zbarvení a zánětu do chronické atrofie a fibrózy (Gade et al., 2021).

Po vhodné antibiotické léčbě mohou u různého počtu pacientů přetrvávat symptomy zejména únava, muskuloskeletální bolesti a kognitivní symptomy. Pro toto seskupení symptomů se vytvořil termín post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS), který se také někdy označuje jako chronická lymeská borelióza. Syndrom je charakterizován v objevujících se symptomech, které přetrvávají šest a více měsíců po léčbě (Cardenas-de la Garza et al., 2019).

1.3 Imunitní odpověď při infekci bakteriemi rodu *Borrelia*

Počáteční vrozená imunitní odpověď je spuštěna rozpoznáním *Borrelia burgdorferi* imunitními buňkami hostitele, například dendritickými buňkami, makrofágy nebo monocyty skrze její molekulární vzory spojené s patogenem (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs). Imunitní buňky hostitele exprimují receptory pro rozpoznávání vzorů patogenů, zejména Toll-like receptory (TLRs) a NOD-like receptory (NLRs). Různé TLRs mohou rozpoznat různé PAMPs *B. burgdorferi* včetně lipoproteinů, flagelinu a RNA. Lipoproteiny

B. burgdorferi indukují hostitelské metaloproteázy štěpící složky mezibuněčné hmoty, které bakteriím umožňují pohyb v tkáních, a rovněž indukují uvolňování zánětlivých cytokinů (Hu et al., 2001). S TLR1 a TLR2 spolupracuje i makrofágy exprimovaný CD14 a společně rozpoznávají bakteriální lipoproteiny *B. burgdorferi*. *In vitro* důkazy ukazují, že blokáce rozpoznání bakteriálních složek pomocí CD14 inhibuje vrozené zánětlivé reakce hostitelských buněk (Sahay et al., 2009).

V počátečním stádiu známém jako erythema migrans je exprese cytokinů převážně prozánětlivá a zahrnuje zvýšené hladiny tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), IL-2, IL-6 a interferonů typu I (IFNs). Biopsie odebraná během prvních dnů infekce ukazuje infiltrát, který se skládá převážně z T buněk, neutrofilů, dendritických buněk, monocytů a makrofágů. U zvířat po inokulaci boreliemi do dermis došlo k vymizení neutrofilů, což naznačuje, že vymizení neutrofilů je důležité pro umožnění vzniku infekce. Také komplement zde hraje významnou roli pomocí opsonizace při aktivaci klasické cesty komplementu. V tomto stádiu můžeme najít i protizánětlivý cytokin IL-10. Vyšší hladiny IL-10 byly spojeny s menším počtem symptomů lymeské boreliózy (Steere et al., 2016).

Během pozdějších fází infekce, jako je časná diseminovaná infekce a artritida, mohou prozánětlivé účinky TLRs hrát velmi důležitou roli. polymorfismus v TLR1, který má za následek sníženou expresi TLR1, je spojen se zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů a přetrvávající artritidou po antibiotické léčbě (Strle et al., 2012).

Dendritické buňky (DC) jsou fagocytární buňky, které detekují a zpracují antigen, aby ho mohly prezentovat buňkám imunitního systému. DC jsou mezi prvními imunitními buňkami, které přijdou do kontaktu s boreliemi v kůži. Po fagocytóze jsou spirochéty zpracovány a prezentovány na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II, což vede k aktivaci a proliferaci CD4⁺ T buněk. Kromě toho, že jsou borelie degradovány v DC fagozómeh pro prezentaci CD4⁺ T buňkám, mohou být živé borelie také v cytoplazmě. Toto může mít za následek, že antigeny spirochét mohou být považovány za vlastní (nebo virové). Díky tomu jsou borelie prezentovány i na molekulách MHC I. třídy, což vede k aktivaci CD8⁺ cytotoxických T buněk (Mason et al., 2014). Druhou významnou imunitní buňkou jsou makrofágy, které i když jsou fenotypově a morfologicky odlišné od dendritických buněk, tak spolu hrají ústřední roli ve vrozené imunitní odpovědi během invaze patogenů. Zatímco oba typy buněk prezentují antigen, makrofágy jsou převážně fagocytární buňky, odstraňují buněčné zbytky a patogeny a zároveň vytvářejí zánětlivou reakci prostřednictvím sekrece

cytokinů, aby aktivovaly adaptivní imunitní systém (Thompson et al., 20021). Určité patogeny včetně *B. burgdorferi* mohou potlačit časné reakce během infekce tím, že způsobí zvýšené uvolňování IL-10 pomocí makrofágů (Lazarus et al., 2008). Další studie ukázaly, že borelie zvyšují hladinu IL-10 nejen u makrofágů, ale i u dendritických buněk (Chung et al., 2008).

CD4+ T buňky mohou poskytnout pomoc při tvorbě specifických protilátek proti *B. burgdorferi*, které jsou klíčové při projevech onemocnění a regulaci zátěže tkáně. Tato zátěž tkáně způsobená spirochétami může být snížena díky imunitních reakcí spojených s CD4+ T buňkami pomocí aktivace buněčné imunitní odpovědi, jako jsou makrofágy (Elsner et al., 2015). *In vivo* deplece buď CD4+ nebo CD8+ T lymfocytů redukovala boreliemi indukované otoky kloubů a snižovala tkáňovou zátěž spirochétami, zatímco deplece CD8+ T lymfocytů samotná snížila závažnost onemocnění například u artritidy a karditidy. T buňky mohou tedy za určitých okolností zhoršit patogenezi Lymeské boreliózy a prodloužit vyléčení choroby (Lasky et al., 2016).

1.4 Únikové mechanismy imunitního systému

Patogenní mikroorganismy se musely naučit překonat první linii vrozené imunity, aby vytvořily perzistentní infekci v lidském hostiteli. *Borrelia burgdorferi* sensu lato si vyvinuly různé způsoby, jak zabránit imunitní odpovědi různých hostitelů a úspěšně v nich dlouhou dobu přežívat (Kraiczy P., 2016).

1.4.1 Rezistence *B. burgdorferi* vůči komplementu

Jedním z únikových mechanismů je se vyhnout komplementu, který je základní součástí vrozené imunity. Komplement obsahuje systém prekurzorů, regulačních a inhibičních proteinů, které lze okamžitě aktivovat po rozpoznání invazních mikroorganismů (Kraiczy P., 2016). Je dobře známo, že *B. burgdorferi* exprimuje na svém povrchu několik lipoproteinů, které vážou lidský inhibitor komplementu faktor H a faktor HL-1 (FH/FHL-1). Předpokládá se, že vazba FH/FHL-1 na povrch borelie zvyšuje schopnost uniknout eliminace během akutní fáze infekce (Kenedy et al., 2009).

Bylo identifikováno až pět odlišných lipoproteinů, které interagují s FH/FHL-1 a souhrnně se nazývají CRASP. Na povrchu mohou být exponovány různé kombinace těchto proteinů. FH/FHL-1 vazebné proteiny zahrnují CspA, CspZ, ErpP, ErpC a ErpA. Proteiny OspE jsou vzhledem k jejich odlišným funkcím, strukturám a organizací genů souhrnně označovány jako OspE-related proteins (Erp). CspA je převládající protein vážající FH/FHL-1 *B. burgdorferi*

a je produkován během sání klíšťat krátce po přenosu na hostitele, ale není produkován u klíšťat, která nesála. Toto ukázalo, že CspA chrání spirochéty před útokem komplementu během infekce tím, že ukončuje sestavení TCC (terminal complement complex). CspZ a CspA vážou plasmin, který dokáže degradovat povrchově vázané C3 a C3b. Dále Erp proteiny slouží jako potenciální ligandy pro plasmin, ale role aktivovaného plasminu při vyhýbání se komplementu vyžaduje další zkoumání (Kraiczky P., 2016).

1.4.2 Flexibilní adaptivní genom a antigenní variabilita *B. burgdorferi*

Borelie se mohou vyhýbat imunitnímu systému díky jejich flexibilnímu adaptivnímu genomu. Jejich lineární chromozom obsahuje zhruba 900 genů kódujících proteiny pro replikaci, transkripci, translaci, metabolismus, transmembránový transport, ale žádné geny pro biosyntézu aminokyselin, mastných kyselin a enzymových kofaktorů, nebo nukleotidů. Tento omezený metabolismus překonávají pomocí genů nacházejících se na devíti lineárních a dvanácti kruhových plazmidech a pomocí metabolických cest v hostiteli. Plazmidy tedy fungují jako unikátní genetické inovátory, které umožňují vyhýbání se imunitnímu systému (Berndtson K., 2013).

Antigenní variabilita je proces, kterým patogen mění sekvenci exprimovaného proteinu, aby se vyhnul škodlivým účinkům protilátek proti němu. Genom *B. burgdorferi* obsahuje lokus variabilního povrchového antigenu E (VlsE), který podléhá rozsáhlé a rychlé antigenní variabilitě v hostiteli. Rekombinace VlsE se zdá být důležitá pro perzistenci *B. burgdorferi* a schopnost *B. burgdorferi* reinfikovat hostitele po léčbě antibiotiky (Tracy & Baumgarth, 2017).

1.4.3 Klíšťecí sliny

Aby klíšťata zabránila obraně hostitele během sání, vylučují ve svých slinách koktejl bioaktivních faktorů, včetně imunomodulačních molekul, inhibitorů hojení ran, mediátorů vazokonstrikce, antihemostatických a protizánětlivých faktorů. Bylo prokázáno, že proteiny slin klíšťat inhibují aktivaci a proliferaci CD4⁺ T lymfocytů vazbou na receptor CD4. Dále bylo zjištěno, že inhibují přirozené zabíječe, dendritické buňky, makrofágy, neutrofile i proteiny stimulující proliferaci B lymfocytů (OspA a OspC). Účinky inhibičních proteinů jsou lokalizované v místě sání a jejich aktivita do 24 hodin klesá. Výsledek je snížení zánětu v místě sání. Jednou z nejrozsáhleji studovaných složek klíšťecích slin je protein Salp15. Výzkum dokázal, že tento protein se specificky váže na CD4 receptor T lymfocytů. Inhibuje

aktivaci a proliferaci CD4⁺ T buněk a brání sekreci IL-2. Dále Salp15 dokáže inhibovat prozánětlivé cytokiny IL-6 a TNF- α produkované dendritickými buňkami (Berndtson K., 2013; Wen et al., 2020). Další studie odhalily, že Salp15 se váže na vnější povrchový protein C (OspC) a díky tomu se může *B. burgdorferi* chránit před komplementem (Bierwagen et al., 2021).

1.4.4 Adheziny *B. burgdorferi*

Adheze je počáteční událost při vzniku jakékoliv infekce. *B. burgdorferi* má nesčetné množství adhesivních proteinů, které usnadňují kontakt s hostiteli. *B. burgdorferi* přilne k hostitelským tkáním prostřednictvím interakcí s hostitelskými buňkami a extracelulární matrix. Adheziny pomáhají boreliím šířit se a přetrvávat v hostitelských tkáních. Mezi adheziny patří i proteiny vázající fibronectin v hostitelském séru. V *B. burgdorferi* bylo identifikováno pět fibronectinových vazebných proteinů: BBK32, RevA/B, BB0347 a CspA. Ukázalo se, že interakce BBK32 s fibronectinem jsou důležité pro počáteční interakci bakterie s endotelem, což je proces nazývaný “molecular braking” (Brissette et al., 2014).

1.5 Inhibiční kontrolní body imunitního systému

Kontrolní body imunitního systému, včetně inhibičních a stimulačních kontrolních molekul, jsou definovány jako interakce určitých receptorů na povrchu buněk s určitými ligandy, které mají inhibiční nebo stimulační účinky na imunitní reakce. Většina molekul imunitních kontrolních bodů, které byly dosud popsány, jsou exprimovány na buňkách vrozeného imunitního systému a T buňkách. Kontrolní body imunitního systému jsou klíčové pro udržení autotolerance a modulaci délky a velikosti imunitních odpovědí pomocí regulace efektorových buněk v různých tkáních tak, aby se minimalizovalo poškození tkáně (Zhang & Zheng, 2020).

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

Rozvoj chronických infekcí a rakoviny je usnadněn řadou mechanismů imunitní subverze, jako je produkce protizánětlivých cytokinů, indukce regulačních T lymfocytů (Tregs) a exprese kontrolních molekul imunitního systému včetně CTLA-4 a PD-1.

Během aktivace T buněk prezentují APC antigeny T buňkám pomocí interakce MHC-TCR a kostimulují T buňky prostřednictvím vazby CD80/86 na CD28. Aktivované T buňky proliferují a vylučují efektorové molekuly (IFN- γ , IL-2, perforin, granzymy). CTLA-4, exprimovaný na T buňkách, omezuje vazbou na CD80/86 kostimulaci prostřednictvím CD28,

což vede k vyčerpání T buněk. Vyčerpané T buňky mají omezenou efektorovou funkci. PD-1 je převážně exprimován na T buňkách a jeho interakce s PD-L1 a PD-L2 exprimovaným na APC a nádorech vysílá negativní signál T buňkám, což může vést k vyčerpání T buněk. Vyčerpání T buněk je charakteristické ztrátou produkce IL-2, sníženou proliferační kapacitou, sníženou cytotoxicitou, zhoršenou produkcí prozánětlivých cytokinů a expresí kontrolních bodů imunitního systému jako jsou právě PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 a TIGIT (Dyck & Mills, 2017).

1.5.2 Inhibiční dráha PD-1/PD-L1

Ligand programované smrti 1 (PD-L1), jinak známý jako B7-H1, nebo CD274, je prvním funkčně charakterizovaným ligandem koinhibičního receptoru programované smrti 1 (PD-1). Spolu se svým příbuzným ligandem PD-L2 hraje PD-L1 klíčovou roli při udržování tolerance periferních a centrálních imunitních buněk prostřednictvím vazby na receptor PD-1. PD-L1 je kódován genem PDCDL1 a u lidí se nachází na chromozomu 9. Poprvé byl popsán Dongem et al v roce 1999 jako B7-H1, PD-L1 byl rozpoznán jako třetí člen rodiny proteinů B7. PD-L1 je transmembránový protein a skládá se z extracelulárních domén podobných IgV a IgC, hydrofobní transmembránové domény a krátkého cytoplazmatického konce složeného z 30 aminokyselin (Kythreotou et al., 2018).

PD-1 patří také k inhibičním molekulám rodiny B7 a je zvýšeně exprimován aktivovanými T buňkami (ale také B buňkami, T regulačními a přirozenými zabíječskými buňkami). PD-1 je rovněž exprimován buňkami prezentujícími antigen (APC). Úloha PD-1 spočívá v inhibiční aktivitě efektorových T-buněk v periferních tkáních během zánětlivé odpovědi na infekci a v regulaci a omezení autoimunity (Bersanelli & Buti, 2017).

Nízkou expresí PD-L1 lze nalézt na klidových lymfocytech, buňkách prezentujících antigen (APC), v buňkách rohovky a v Langerhansových ostrůvkách (Kythreotou et al., 2018). PD-L1 uděluje určitým tkáním privilegovaný stav. Imunitní privilegium představuje speciální imunologický stav, kdy mohou být cizí antigeny tolerovány a nevyvolají imunitní odpověď. Mezi tyto určité tkáně patří centrální nervový systém, placenta, varlata a vlasové folikuly (Wang et al., 2017). Exprese PD-L1 je primárně ovlivněna Toll-like receptory (TLR), ale i receptorem pro IFN- γ (Kythreotou et al., 2018).

Dráha PD-1/PD-L1 je klíčová pro rozvoj imunitní tolerance, což je proces negativní selekce lymfocytů probíhající v primárních a sekundárních lymfatických orgánech. Exprese PD-L1 se

uskutečňuje v brzlíku a na dendritických buňkách, kde interakce PD-1/PD-L1 brání proliferaci a diferenciaci naivních T buněk. Dále dráha PD-1/PD-L1 zabraňuje destrukci tkáně při chronické infekci pomocí imunitního vyčerpání, tj. poškození funkce efektorových T buněk po přetrvávající prezentaci antigenu. Základní rys vyčerpaných T buněk zahrnuje indukci různých koinhibičních drah včetně PD-1/PD-L1 (Kythreotou et al., 2018).

1.5.3 Imunitní kontrolní body u rakoviny

Role imunologických kontrolních bodů se přenesla do léčby mnoha typů rakoviny, jelikož jsou snadno blokovány protilátkami nebo rekombinantními formami ligandů či receptorů (Rahimi et al., 2020). T buňky, zejména cytotoxické T buňky (CTL) a Th1 buňky vylučující IFN- γ hrají klíčovou roli při kontrole růstu nádoru (Dyck & Mills, 2017).

Po prezentaci antigenu a aktivaci APC mohou CD8⁺ T lymfocyty zabíjet nádorové buňky mnoha mechanismy. Klíčovým mechanismem zabíjení je uvolnění perforinu a granzymů, které naruší plazmatickou membránu nádorových buněk, což vede k jejich apoptóze. Dále uvolněný IFN- γ přispívá ke smrti nádorových buněk pomocí zvýšené exprese MHC třídy I na nádorových buňkách (Apetoh et al., 2015).

Potlačení protinádorových odpovědí T buněk je z velké části zprostředkováno T regulačními lymfocyty (Tregs) a kontrolními body imunitního systému, jako jsou CTLA-4 a PD-1, kde CTLA-4 byl první imunitní kontrolní bod, na který byla zaměřena na léčbu rakoviny (Dyck & Mills, 2017). Nedávná data skutečně ukázala, že blokování PD-1 a CTLA-4 může regulovat funkce Tregs a posílit protinádorovou odpověď. Nicméně přímá role a funkce PD-1 na Tregs u rakoviny zůstává neznámá (Duraismwamy et al., 2013).

Protilátky vázající se na PD-1 a PD-L1 skutečně prokázaly pozoruhodnou účinnost zejména v kombinovaných terapiích pro řadu typů nádorů a byly licencovány pro léčbu melanomu, nemalobuněčné rakoviny plic, rakoviny ledvin a rakoviny měchýře. Navíc bylo prokázáno, že inhibiční kontrolní body imunitního systému zvyšují reakce efektorových T buněk u pacientů s parazitární infekcí, například u malárie (Dyck & Mills, 2017).

1.5.4 Kontrolní body u chronických infekcí

Inhibiční receptory a jejich role při vyčerpání T buněk byly podrobně studovány zejména u rakovin, bakteriálních a parazitických infekcí, chronických virových infekcí, včetně hepatitidy B, hepatitidy C, HIV a akutní virové infekce, jako je Hantavirus a Ebola.

Vyčerpání T buněk, ke kterému dochází během chronické infekce a rakoviny, se také vyskytuje u pacientů s COVID-19. Předchozí experimentální studie o funkčnosti T buněk u pacientů s COVID-19 prokázaly zvýšenou expresi inhibičních receptorů, jako je PD-1 (Barnova et al., 2021; Vivarelli et al., 2021). Infekce *Helicobacter pylori* je spojena s gastritidou, vředy a rakovinou žaludku. Infekce se stává chronickou, protože imunitní systém hostitele ji nedokáže odstranit. Žaludeční epiteliální buňky (GEC) hrají v imunitní odpovědi hostitele velmi důležitou roli, protože se na nich detekovala exprese PD-L1, která se výrazně zvýšila po infekci *H. pylori*. Exprese PD-L1 také inhibuje T buňkami zprostředkovanou syntézu IL-2 (Das et al., 2006). Patogenní bakterie *Porphyromonas gingivalis* prostřednictvím svých peptidoglykanů připojených k membráně využívá kontrolní bod PD-1/PD-L1 k vyhnutí se imunitní reakci a zesílení infekce (Bailly C., 2020).

V další studii data ukazují, že LAG-3, který je primárně exprimován na CD4+ T buňkách, se shoduje s vysokou bakteriální zátěží a aktivní tuberkulózou (Phillips et al., 2015). Některé intracelulární bakterie, např. *Listeria monocytogenes*, mohou pomocí zvýšené indukce inhibitoru TIM-3 potlačovat expresi molekul MHC I. třídy a tím se vyhnout účinné imunitní odpovědi (Wang et al., 2020).

Plísňová sepe je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Současná experimentální zjištění poskytují preklinická data, která podporují tvrzení, že terapie anti-PD-1/PD-L1 a anti-CTLA-4 protilátkami nabízí nový přístup k léčbě mykotické sepe a plísňových infekcí obecně (Chang et al., 2013).

2 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše o lymeské borelióze a roli imunitních kontrolních bodů při imunitní odpovědi
- Stanovení exprese PD-1/PD-L1 u myších buněk imunologické synapse *in vitro* po aktivaci *B. burgdorferi* sensu stricto
- Určení míry proliferace T lymfocytů a produkce vybraných cytokinů po interakci myších dendritických buněk a T lymfocytů
- Stanovení vlivu anti-PD-L1 neutralizační protilátky na výše uvedené jevy

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní myši

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

3.2 Borelie

Spirochety *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen ATCC® 35211™) a *Borrelia afzelii* (kmen CB43) byly kultivovány v médiu BSK-H doplněném 6% králičím sérem při 34 °C do log fáze ($\approx 5 \times 10^7$ /ml) a poté použity v experimentech.

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

počet borelií ml⁻¹ = a \times ředění $\times 5,01 \times 10^5$

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

Z boreliové kultury bylo poté odebráno takové množství suspenze, aby obsahovalo požadovaný počet borelií (5×10^5 na jamku).

3.3 Izolace kostní dřene a derivace plazmacytoidních dendritických buněk (pDC)

Tab. I: Seznam chemikálií pro izolaci kostní dřene a derivaci pDC

| Název a složení chemikálie: |
|---|
| 70% Ethanol |
| Izopropanol |
| MEM (Minimal Essential Medium; Gibco) |
| 0,84% NH ₄ Cl |
| Trypanová Modř (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich) |
| RPMI 1640 (10% fetální telecí sérum, Penicillin 100 j./ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Alanyl-L-Glutamine 0,446 g/l, 2-Mercaptoethanol 50 µM (Biosera), pyruvát sodný 1mM (Sigma), Flt-3L 200 ng/ml (R&D) |
| Sterilní PBS (phosphate-buffered saline; VWR) |

Myš jsem uvedla do celkové inhalační anestézie a poté jsem ji usmrtila zlomením vazy. Dále jsem ji upevnila na chirurgickou podložku do polohy na zádech a sterilizovala jsem srst v oblasti břicha a zadních končetin 70% ethanolem. Poté jsem vypreparovala zadní končetiny a vložila je do sterilního PBS. Očištěné stehenní a holenní kosti jsem nejdříve vložila do izopropanolu a poté do MEM (Minimal Essential Medium; Gibco). Kosti jsem propláchla 5 ml injekční stříkačkou s jehlou o velikosti 24-25 G pomocí MEM. Vizuální kontrolou jsem ověřila, zda v kosti nezbyla žádná kostní dřev, kosti by se měly jevit jako bílé. Poté jsem rozsuspendovala kostní dřev a přefiltrovala ji přes sterilní buněčné síto (Corning, 70 µm Nylon) do zkumavky.

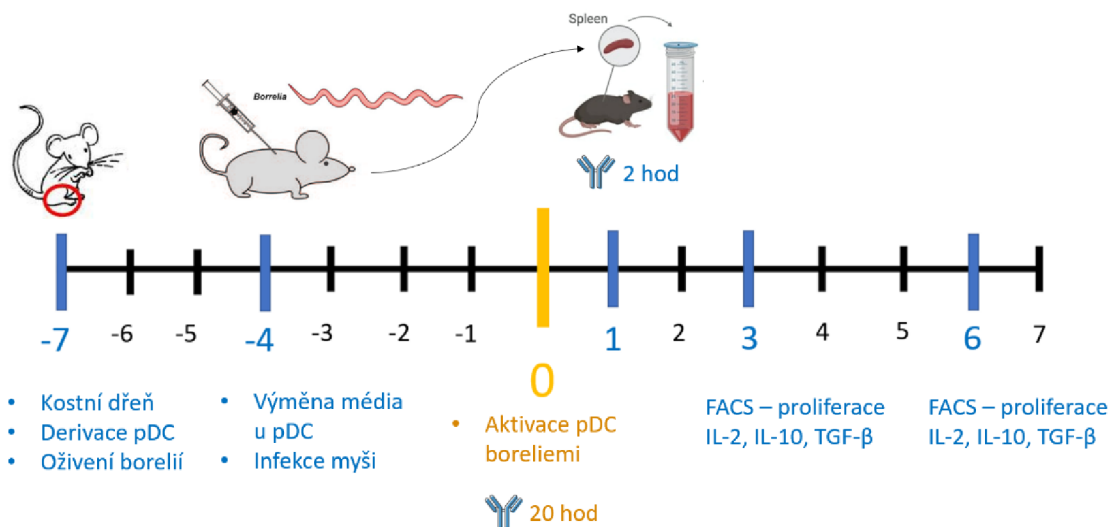
Dále jsem suspenzi buněk dala centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Po centrifugaci jsem odstranila supernatant a provedla lýzu erytrocytů přidáním 2 ml 0,84 % NH₄Cl ohřátého na 37 °C k peletu. Lýzu jsem zastavila po 2 minutách přidáním 10 ml MEM. Buňky jsem spočítala v Bürkerově komůrce pomocí Trypanové modři (0,5% vodný roztok; Sigma-Aldrich) ředěné 1:1.

Nakonec jsem dala určené množství buněk znovu centrifugovat, a následně jsem buňky převedla do kultivačního média pro derivaci pDC kompletního RPMI 1640 a nasadila buňky (3×10^6 buněk/jedna jamka) na 6 jamkový panel. Buňky byly kultivovány ve tmě v 37°C s CO_2 . Výměnu média jsem uskutečnila třetí den od derivace plazmacytoidních dendritických buněk, kdy jsem odsála 800 μl starého média a vyměnila ho za 1 ml čerstvého. Derivaci pDC jsem dokončila po sedmi dnech, kdy jsem buňky aktivovala přidáním borelií (den 0, Obr. 1).

3.4 Aktivace pDC boreliemi a ošetření anti-PD-L1 protilátkou

Plazmacytoidní dendritické buňky (5×10^4 buněk/jamka) jsem aktivovala pomocí borelií (5×10^5 buněk/jamka, MOI 10) po dobu 24 hodin. Neutralizační anti-PD-L1 protilátku (BioXCell InVivoMAb, $c = 20 \mu\text{g/ml}$) jsem k pDC s boreliemi přidala 20 hodin a 2 hodiny před začátkem kokultivace s T buňkami.

Schéma pokusu:



Obr.1: Časové schéma pokusu

3.5 Infekce myši a izolace splenocytů

Tab. II: Seznam chemikálií pro infekci myši a izolaci splenocytů

| Název a složení chemikálie: |
|--|
| Ketamin (100 mg/kg) |
| Xylazin (16 mg/kg) |
| RPMI 1640 (10% fetální telecí sérum, Penicillin 100 j./ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Alanyl-L-Glutamine 0,446 g/l, 2-Mercaptoethanol 50 µM (Biosera) |
| 0,84 % NH ₄ Cl |

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

Z infikované myši jsem odebrala slezinu z dutiny břišní pomocí sterilních nůžek a pinzety. Slezinu jsem poté dala do 15ml zkumavky s RPMI 1640 (10 % sérum FCS, Gln, merkaptoethanol; Biosera) Dále na vytvoření jednobuněčné suspenze ze sleziny jsem umístila orgán do buněčného síta v Petriho misce obsahující vychlazené kompletní RPMI. Pomocí pístu 5ml injekční stříkačky jsem protlačila slezinu přes buněčné síto (Corning, 70 µm Nylon). Dále jsem přenesla buněčnou suspenzi do nové zkumavky o objemu 15ml a promyla buněčné síto vychlazeným kompletním RPMI, zbývající buněčnou suspenzi jsem přidala do stejné zkumavky a dala centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Po centrifugaci jsem odstranila supernatant a provedla lýzu erytrocytů pomocí rozsuspendování peletu buněk v 2 ml 0,84 % NH₄Cl ohřátého na 37°C. Po dvou minutách jsem lýzu erytrocytů zastavila přidáním 10 ml kompletního RPMI. Splenocyty jsem nakonec spočítala v Bürkerově komůrce.

3.6 Barvení pomocí CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit

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

Barvivo jsem připravila smícháním 1 ml sterilního PBS a 2 µl CellTrace Violet, poté přidala k buněčnému peletu a nechala společně inkubovat 20 minut ve tmě v 37 °C. Po uplynutí inkubační doby jsem přidala 5 ml RPMI pro zastavení reakce a dala označené buňky

centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Nakonec jsem obarvené splenocyty (3×10^5 /jamka) přidala k pDC aktivovaným boreliemi, z kterých jsem těsně předtím odsála 170 μ l média.

3.7 Měření na průtokovém cytometru

V určených časových intervalech po inkubaci s pDC (48 a 120 hodin) jsem buňky dala centrifugovat na (130 g, 10 minut, 4 °C), abych poté odebrala a uschovala supernatanty při -20 °C za účelem stanovení cytokinů.

Dále jsem promyté T lymfocyty převedla do FACS pufru (0,12% BSA v PBS) protilátkami proti povrchovým antigenům CD3 (eBioscience™, FITC, ředění 100 \times), CD4 (eBioscience™, PE, ředění 200 \times), CD8 (eBioscience™, PE-Cyanine7, ředění 400 \times) a PD1 (eBioscience™, APC, ředění 50 \times).

Vzorky s protilátkami jsem nechala inkubovat ve tmě 20 minut na ledu. Poté jsem zbytky nenavázané protilátky vymyla FACS puftrem. Nakonec jsem označené buňky změřila na průtokovém cytometru NovoCyte 3000 (Acea) a výsledná data byla analyzována pomocí softwaru NovoExpress. Prezentovaná data vycházejí z buněk nesoucí marker CD3 a pro stanovení indexů proliferace jsem použila funkci Cell proliferation plot.

Tab. III: Indexy proliferace

| Název: | Význam |
|---|--|
| Frekvence proliferujících buněk (Frequency of divided cells) | Procento původních buněk, které se rozdělilo aspoň jedenkrát. |
| Index dělení (Division index) | Průměrný počet buněčných dělení, kterým prošla buňka v původní populaci. Zahrnuje i buňky, které se nikdy nerozdělily. |
| Proliferační index (Proliferation index) | Počet dělení dělivších se buněk. |

3.8 Cytokinová ELISA

V určených časových intervalech po inkubaci s pDC (48 a 120 hodin) jsem odebrala vzorky kultivačního média. Hladinu sekretovaného TGF- β , IL-2 a IL-10 v těchto vzorcích jsem stanovila pomocí komerčních ELISA kitů dle protokolu výrobce (TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates, Invitrogen; Mouse IL-2 DuoSet ELISA, R&D). Absorbanci při 450 nm jsem změřila na vertikálním spektrofotometru Synergy H1 Microplate Reader

(Biotec). V programu MS Excel jsem sestrojila kalibrační přímku a provedla přepočet hodnot absorbance na koncentraci testovaného cytokinu ve vzorcích.

3.8.1 Stanovení TGF- β

TGF- β v buněčných supernatantech jsem detekovala pomocí Human/Mouse TGF beta 1 Uncoated ELISA (Invitrogen™). Na 96-jamkovým mikrotitrační destičku (Costar) jsem navázala 50 μ l vazebné protilátky, kterou jsem naředila 250 \times ve vazebném pufru a nechala inkubovat přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C.

Druhý den jsem panel promyla PBS s Tweenem 20 a přidala 200 μ l blokovacího roztoku (ELISA ředící roztok, a panel jsem inkubovala 1 hodinu ve vlhké komůrce v laboratorní teplotě). Po uplynutí inkubační doby, jsem panel opět promyla a přidala 50 μ l testovaných vzorků a standard (rekombinantní TGF- β o koncentraci 1000 pg/ml) pro kalibraci. Vzorky jsem předtím aktivovala pomocí acidifikace. Panel jsem nechala inkubovat přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C.

Třetí den jsem pokračovala promytím destičky a přidala jsem 50 μ l detekční protilátky, která se ředila 250 \times v ELISA ředícím roztoku a inkubovala jsem ji po dobu 1 hodiny. Poté jsem vymyla zbytky nenavázané detekční protilátky a přidala jsem 50 μ l avidinu značeného peroxidázu (ředění 250 \times v ELISA ředícím roztoku) a nechala jsem ho inkubovat po dobu 30 minut, následně jsem provedla poslední promývání a přidala 50 μ l substrátu, který jsem nechala působit 15 minut a poté jsem reakci zastavila přidáním 50 μ l 2 M H₂SO₄.

3.8.2 Stanovení IL-2 a IL-10

IL-2 jsem detekovala pomocí kitu Duoset ELISA Development System Mouse IL-2. Na 96 jamkový panel jsem navázala vazebnou protilátku ředěnou 120 \times ve vazebném pufru. Společně jsem to nechala inkubovat přes noc ve vlhké komůrce při pokojové teplotě.

Druhý den jsem panel promyla pomocí PBS a Tweenu 20 a do každé jamky jsem napipetovala 300 μ l blokovacího roztoku, který jsem naředila 10 \times v deionizované H₂O a inkubovala jsem ve vlhké komůrce při pokojové teplotě 1,5 hodiny. Následně jsem panel promyla a přidala jsem 50 μ l vzorků a standard (o koncentraci 1000 pg/ml) pro kalibraci. Panel jsem poté nechala inkubovat přes noc při pokojové teplotě ve vlhké komůrce.

Třetí den jsem začala promýváním panelu a poté jsem přidala 50 μ l detekční protilátky, kterou jsem naředila 60 \times v ředícím roztoku (ředění 10 \times v deionizované H₂O) s Tris puforem + 0,05% Tween 20 a nechala ji inkubovat po dobu 2 hodin ve vlhké komůrce při pokojové teplotě.

Následně jsem panel promyla a přidala 50 μ l streptavidinu značeného peroxidázou, který jsem naředila 40 \times v ředícím roztoku a inkubovala ho 20 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Následně jsem provedla další promytí a přidala jsem 50 μ l substrátu, který jsem nechala inkubovat 15 minut a poté jsem reakci zastavila přidáním 50 μ l 2 M H₂SO₄.

Pro detekci IL-10 jsem použila kit DuoSet ELISA Development System Mouse IL-10 a postup byl obdobný jako u IL-2 kromě toho, že se detekční protilátka ředila jen v ředícím roztoku bez Tris pufu a 0,05% Tween 20.

3.9 Magnetická separace neutrofilů pomocí kitu MACS Miltenyi biotec

Buňky kostní dřeně jsem nejdříve vyzolovala standardním způsobem (viz kap. 1.3) a počítala je v Bürkerově komůrce. Dále jsem je dala centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C) a poté jsem odstranila supernatant a pelet rozsuspendovala v 200 μ l MACS pufu (2 mM EDTA v PBS + 2% BOFES). Následně jsem k suspenzi buněk přidala Neutrophil Biotin-Antibody cocktail a nechala společně inkubovat 10 minut ve tmě v lednici.

Po inkubační době jsem buňky promyla přidáním 5-10 ml MACS pufu a znovu dala centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Supernatant jsem slila a pelet znovu rozsuspendovala v 400 μ l MACS pufu a přidala 100 μ l Anti-Biotin Microbeads a opět jsem společně nechala inkubovat 15 minut ve tmě v lednici.

Buňky jsem poté promyla přidáním 5-10 ml MACS pufu a nechala je centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C). Supernatant jsem slila a pelet rozsuspendovala v 500 μ l MACS pufu.

Kolonku jsem připevnila na magnet drážkami ven a aktivovala ji propláchnutím 3 ml MACS pufu. Dále jsem nanasla na kolonku buňky a nechala volně prokapat. Kolonku jsem promyla třikrát 3 ml MACS pufu. Buňky, které prošly kolonkou, byla frakce neutrofilů.

Nakonec jsem získané neutrofilů naposledy dala centrifugovat (130 g, 10 minut, 4 °C), poté jsem je počítala a nasadila (2×10^5 /jamku) na 96 jamkový panel. Neutrofilů jsem kultivovala v kompletním RPMI 1640.

K neutrofilům jsem poté přidala *Borrelia afzelii* a *B. burgdorferi sensu stricto* (1×10^6 /jamku), které jsem společně kultivovala 24 hodin. Dále jsem je označila je proti povrchovým antigenům CD86 (eBioscience™, APC, ředění 400 \times), PD-L1 (eBioscience™, PECy7, ředění 200 \times), Ly6G (eBioscience™, AlexaFluor700, ředění 500 \times) a značené buňky jsem nakonec změřila na průtokovém cytometru FACS Canto II (BD).

3.10 Statistická analýza

Všechny experimenty jsem prováděla v biologických triplikátech. Statistické vyhodnocení dat jsem provedla v programu GraphPad Prism pomocí jednocestné (kap. 4.1 a 4.2) a dvoucestné (kap. 4.3) analýzy variance a Tukeyho *post-hoc* testu. Statisticky významné rozdíly jsou v grafech označeny hvězdičkami (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; ns = nesignifikatní). Hodnoty v grafech jsou vyneseny jako aritmetický průměr naměřených hodnot + střední chyba průměru (SEM).

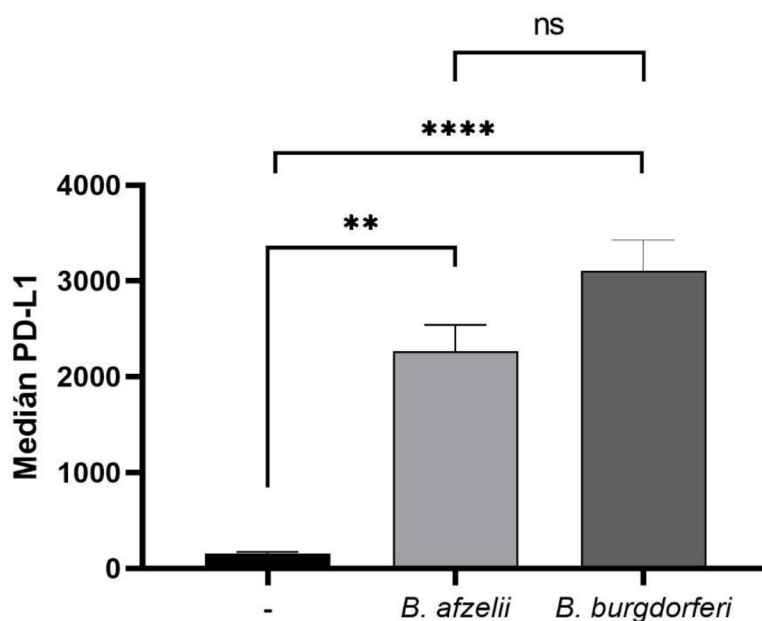
4 Výsledky

4.1 Indukce PD-L1 boreliemi

Expresi PD-L1 jsem nejdříve testovala na neutrofilech z důvodu jejich snadné dostupnosti v kostní dřeni.

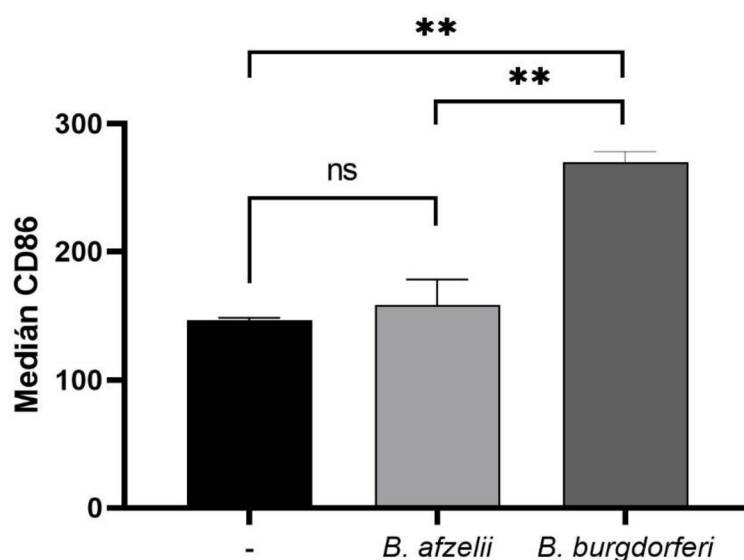
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jaký druh borelií indukuje více PD-L1, IL-10 a CD86.

Na grafu (Obr. 2) je znázorněno množství PD-L1 indukovaného *B. afzelii* a *B. burgdorferi* vyhodnocené po 24 hodinách pomocí průtokového cytometru FACS Canto II (BD). Z grafu je patrné, že nestimulované buňky neprodukuje nijak významnou hladinu PD-L1, na rozdíl od buněk stimulovaných boreliemi, kde nejvyšší hladina PD-L1 byla indukována *B. burgdorferi*, a to 19,53× více než u kontrolní skupiny neutrofilů, zatímco *B. afzelii* ve srovnání s kontrolní skupinou stimulovaly expresi PD-L1 pouze 14,23× více. U obou druhů borelií byly hodnoty exprese PD-L1 statisticky významně zvýšené ve srovnání s kontrolní skupinou.



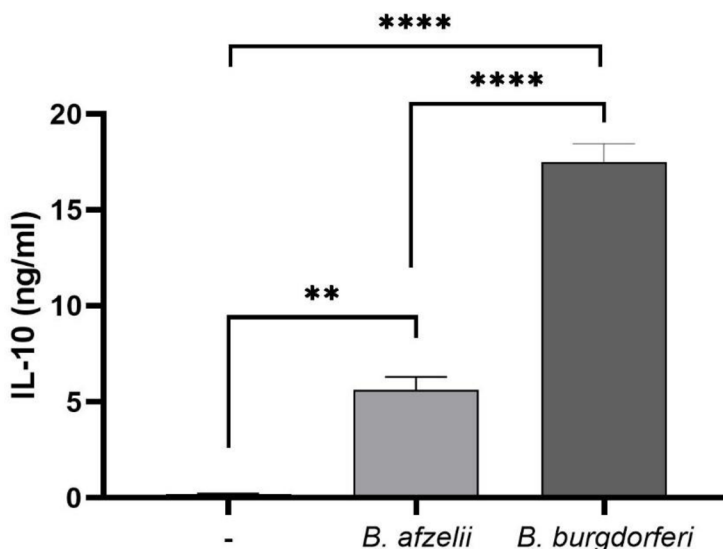
Obr. 2: Expresi PD-L1 u myších neutrofilů stimulovaných *B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto po 24 hodinách kokultivace. Graf reprezentuje medián intenzity fluorescence PD-L1 po aktivaci neutrofilů pomocí *B. afzelii* a *B. burgdorferi*. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,0001$ ****, ns = nesignifikantní.

Dále jsem v týchž buňkách sledovala expresi kostimulační molekuly CD86 indukované *B. afzelii* a *B. burgdorferi* vyhodnocenou pomocí průtokového cytometru FACS Canto II (BD). Z grafu (Obr. 3) lze vyčíst, že spirochéty *B. afzelii* nijak nestimulovaly expresi CD86, zatímco aktivace *B. burgdorferi* vedla k statisticky signifikantnímu nárůstu exprese CD86, jak oproti kontrolní skupině neutrofilů, tak i oproti *B. afzelii*.



Obr. 3: Expresie CD86 u myších neutrofilů stimulovaných *B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto po 24 hodinách kokultivace. Graf reprezentuje medián intenzity fluorescence CD86 po aktivaci neutrofilů pomocí *B. afzelii* a *B. burgdorferi*. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,01$ **, ns = nesignifikantní.

V následujícím grafu (Obr. 4) je znázorněno množství IL-10 produkovaného neutrofilů stimulovanými *B. afzelii* a *B. burgdorferi* stanoveného pomocí metody ELISA. Tento graf ukazuje, že nestimulované buňky neprodukovaly téměř žádný IL-10, ale po přidání *B. afzelii* a *B. burgdorferi* se hladina IL-10 statisticky významně zvýšila. Nejvýraznější a také statisticky významná produkce IL-10 byla detekována u neutrofilů stimulovaných *B. burgdorferi*, a to až 3,11× více než *B. afzelii*.



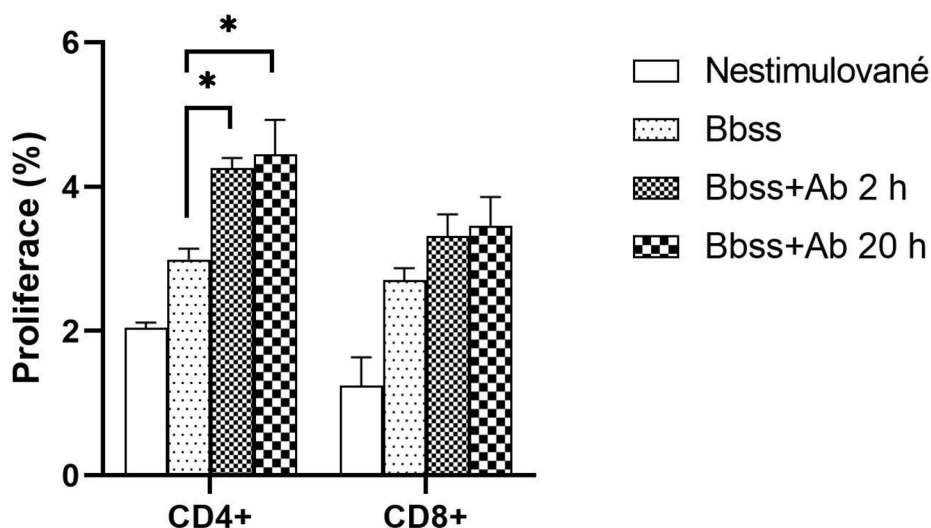
Obr. 4: Expres IL-10 u myších neutrofilů stimulovaných *B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto po 24 hodinách kokultivace. Graf reprezentuje průměrnou sekreci IL-10 po aktivaci neutrofilů pomocí *B. afzelii* a *B. burgdorferi*. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,0001$ ****

4.2 Vliv osy PD-1/PD-L1 na proliferaci T lymfocytů

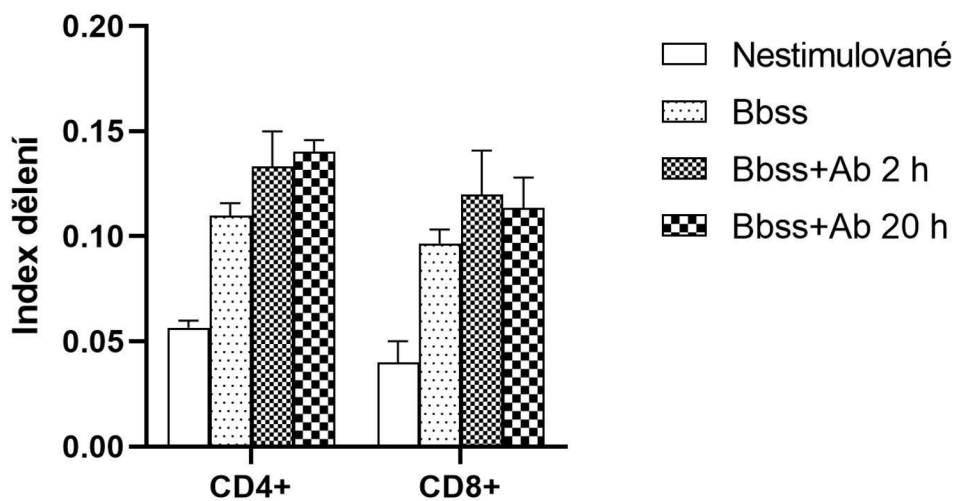
Cílem následujícího experimentu bylo zjistit, zda by bylo možné zvýšit proliferaci specifických T lymfocytů pomocí blokování vazby PD-1/PD-L1 anti-PD-L1 protilátkou aplikovanou ve dvou různých časech před přidáním T lymfocytů. Díky průtokové cytometrii jsem zjistila, že neutrofilů nejsou vhodné pro indukci proliferace T lymfocytů, proto jsem další pokusy prováděla s plazmacytoidními dendritickými buňkami. Tento pokus byl proveden celkem dvakrát s podobnými výsledky.

Proliferace byla sledována za 48 hodin a 120 hodin kokultivace. V čase 48 hodin byla úroveň proliferace T buněk velmi malá a stanovené proliferační indexy jsou tedy zatíženy velkou chybou, proto jsou v následující pasáži uvedeny pouze výsledky z měřeného času 120 hodin kokultivace.

Z grafu (Obr. 5) lze vyčíst frekvenci proliferujících T buněk, tj. buněk, které se rozdělily alespoň jedenkrát během pětidenní kokultivace s pDC. Vlivem aktivace pDC pomocí *B. burgdorferi* se statisticky významně zvýšil podíl proliferujících CD4+ T lymfocytů. U CD4+ buněk je znázorněno, že preinkubace s protilátkou po dobu dvou a dvaceti hodin vedla k statisticky průkaznému zvýšení procenta proliferujících buněk. U CD8+ buněk je tento trend stejný, ale není statisticky průkazný. Tento výsledek je ve shodě s tzv. indexem dělení (division index) (Obr. 6), kde se taktéž po aktivaci boreliemi a přidání anti-PD-L1 protilátky zvýšil počet dělení T buněk, ale rozdíl není statisticky signifikantní.

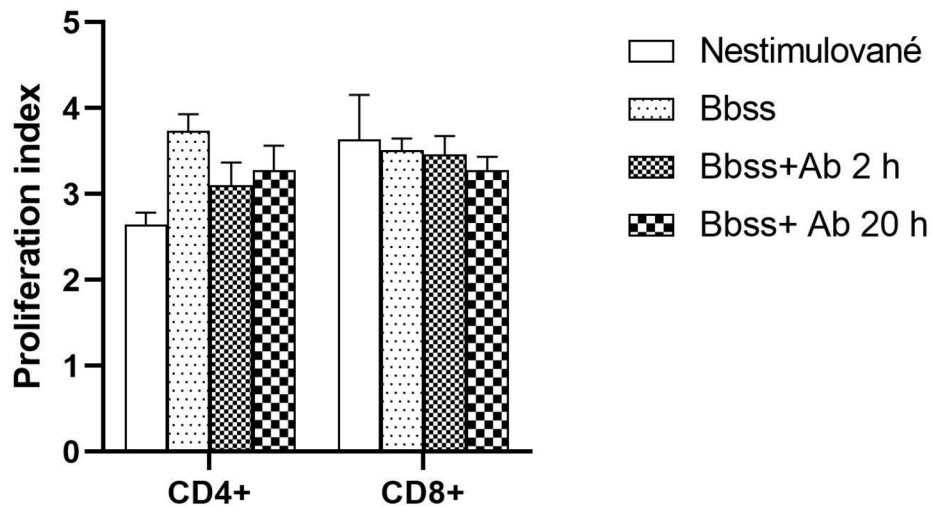


Obr. 5: Frekvence proliferujících CD4+ a CD8+ buněk 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje průměrnou frekvenci proliferujících T buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny statistické významnosti: $p \leq 0,05$ *.



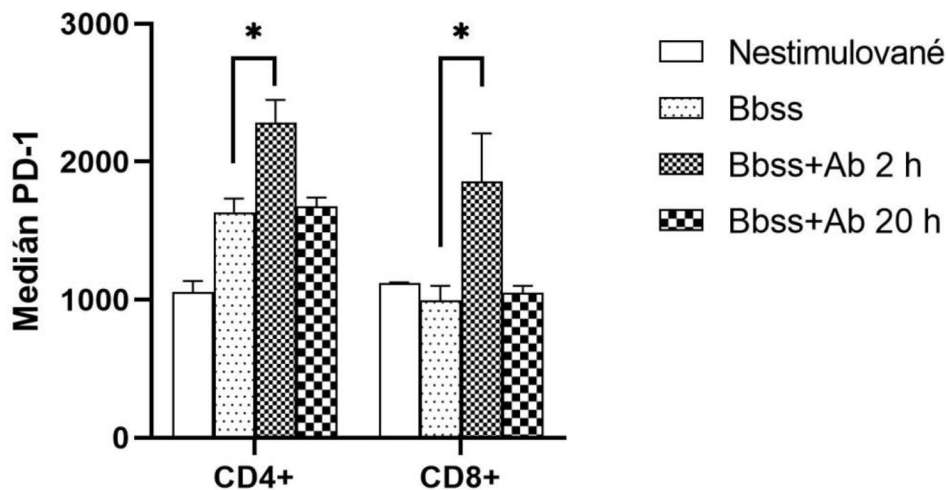
Obr. 6: Index dělení CD4+ a CD8+ buněk v intervalu 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Index dělení označuje průměrný počet buněčných dělení, kterým prošla buňka v původní populaci. Zahrnuje i buňky, které se nikdy nerozdělily. Graf reprezentuje index dělení prolifерujících T buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Zde byly výsledky statisticky nesignifikantní $p > 0,05$.

Software pro analýzu dat z průtokové cytometrie umožňuje stanovit různé parametry proliferace, ale ne všechny jsou ošetřením anti-PD-L1 protilátkou ovlivněny. Např. proliferační index, který označuje počet dělení dělivších se buněk, nebyl neutralizační anti-PD-L1 protilátkou ovlivněn (Obr. 7).



Obr. 7: Index proliferace CD4+ a CD8+ buněk v intervalu 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Index proliferace je označení pro počet dělení dělivších se buněk. Graf reprezentuje průměrnou hodnotu indexu u T buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Zde byly výsledky statisticky nesignifikantní $p > 0,05$.

Na grafu (Obr.8) je znázorněna PD-1 exprese u CD4+ a CD8+ T buněk. U dvouhodinové inkubace protilátky s buňkami došlo k signifikantnímu zvýšení exprese PD-1 na obou typech T buněk, naproti tomu u dvacetihodinové preinkubace s protilátkou nebyl nárůst exprese PD-1 zaznamenán.

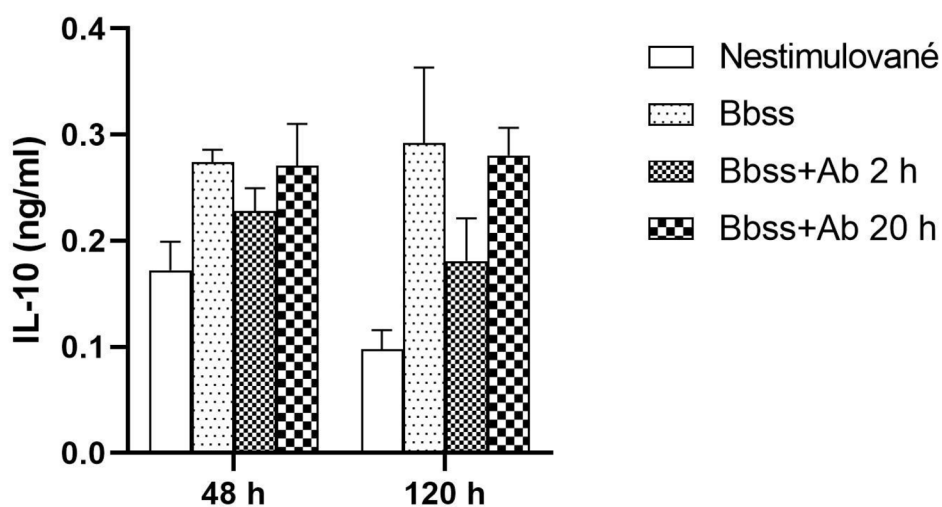


Obr. 8: Exprese PD-1 u CD4+ a CD8+ T buněk 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje medián intenzity fluorescence PD-1 u T buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Hladiny významnosti: $p \leq 0,05$ *.

4.3 Produkce cytokinů

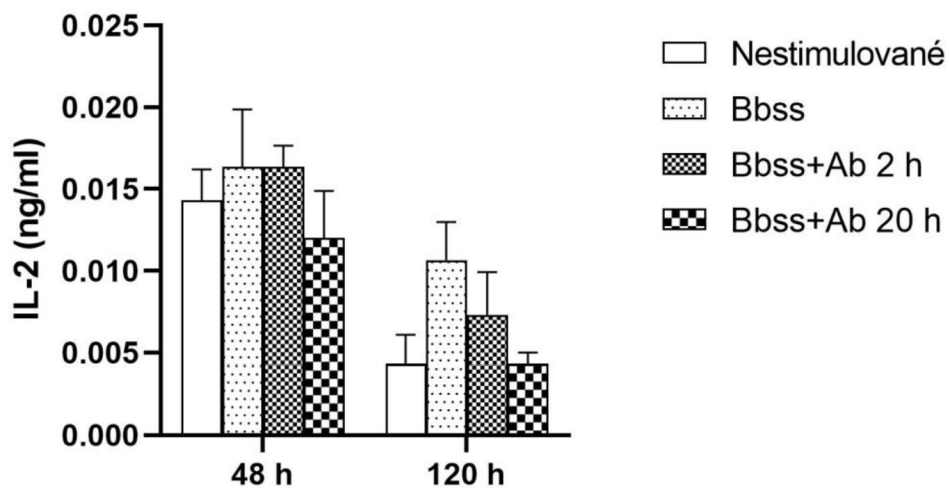
Ze supernatantů z pokusů popisovaných v kapitole 4.2. jsem stanovila množství IL-10, IL-2 a TGF- β .

V prvním grafu (Obr. 9) můžeme vidět v obou časových intervalech u protilátky s preinkubací 2 hodiny sníženou hodnotu IL-10, ale tento stav není statisticky signifikantní. Na druhou stranu dvacetihodinová preinkubace s protilátkou neměla vliv na produkci IL-10.



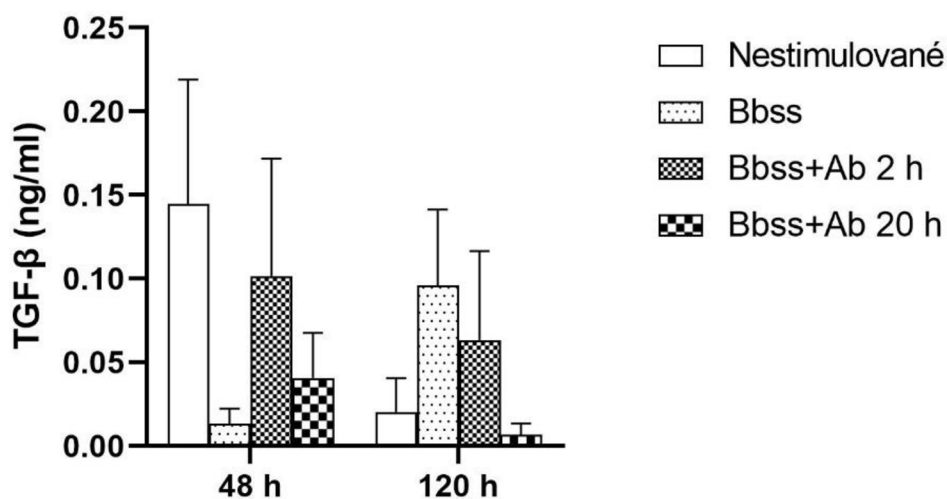
Obr. 9: Množství IL-10 v intervalech 48 a 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje průměrnou sekreci IL-10 ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace anti-PD-L1 protilátky s pDC.. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Zde byly výsledky statisticky nesignifikantní $p > 0,05$.

V následujícím grafu (Obr.10) je zřejmá snížená produkce IL-2 u pDC ošetřených protilátkou po dobu 20 hodin v intervalu 48 hodin kokultivace, stejný trend byl i v druhém časovém intervalu, kde ještě navíc je znázorněno snížení u pDC ošetřených protilátkou po dobu 2 hodin oproti pDC aktivovanými boreliemi bez ošetření protilátkou. Uvedené rozdíly však nejsou statisticky signifikantní.



Obr. 10: Množství IL-2 v intervalech 48 a 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje průměrnou sekreci IL-2 ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace anti-PD-L1 protilátky s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Zde byly výsledky statisticky nesignifikantní $p > 0,05$.

Zjištěné hladiny TGF- β v buněčných supernatantech (Obr. 11) byly celkově velmi nízké a vykazovaly velké rozdíly v rámci biologického triplikátu. Přesto je v intervalu 120 h patrné statisticky nevýznamné snížení sekrece TGF- β zejména u buněk ošetřených anti-PD-L1 protilátkou (preinkubace 20 h) oproti vzorku buněk bez protilátky.



Obr. 11: Množství TGF- β v intervalech 48 a 120 hodin od kokultivace pDC s T lymfocyty. Graf reprezentuje průměrnou sekreci TGF- β ve dvou časových intervalech 2 a 20 hodin preinkubace anti-PD-L1 s pDC. Statistická analýza byla provedena pomocí testu Anova. Zde byly výsledky statisticky nesignifikantní $p > 0,05$.

5 Diskuze

Borrelia burgdorferi způsobuje přetrvávající infekci, pokud není včas a správně léčena antibiotiky. Přetrvávající povaha infekce může vést k rozvoji chronického onemocnění (Bolz, Weis, 2004). Aby spirochéty *Borrelia burgdorferi* vytvořily perzistentní infekci, vyvinuly si různé způsoby překonání vrozené imunity (Kraiczky P., 2016). Důležitým mechanismem imunitní rezistence jsou imunitní inhibiční dráhy, nazývané imunitní kontrolní body, které zprostředkovávají imunitní toleranci a zmírňují vedlejší poškození tkáně (Pardoll D. M., 2012).

Předložená práce je první studií řešící dosud neznámou problematiku, zda inhibiční kontrolní body imunitního systému, konkrétně osa PD-1/PD-L1 hraje určitou roli při infekci *B. burgdorferi* v myším modelovém systému. Z předchozích měření v naší laboratoři je známo, že borelie indukují PD-L1 u myších dendritických buněk i neutrofilů. První experiment vedl k tomu, abychom dva běžně používané kmeny *B. afzelii* CB43 a *B. burgdorferi* sensu stricto ATCC 35211 srovnaly za účelem rozhodnutí, s kterým kmenem budeme pracovat v dalších experimentech. *B. burgdorferi* ve všech parametrech indukovaly vyšší povrchovou expresi jak aktivačního markeru CD86, tak inhibičního receptoru PD-L1, dále indukovaly výrazně vyšší hladinu IL-10 než *B. afzelii* (Obr. 2, 3, 4). IL-10 je protizánětlivý, tlumivý cytokin, takže jsme dospěly k závěru, že *B. burgdorferi* jsou vhodnějším modelem pro studium boreliemi navozené imunosuprese.

Zánětlivé reakce v hostiteli jsou dysregulovány *B. burgdorferi* mj. rychlým zvýšením exprese IL-10. IL-10 potlačuje i reakce imunitních buněk, které migrují do ložiska infekce. To spirochétám poskytuje dostatečný čas, který potřebují k tomu, aby se vhodně přizpůsobily svému novému hostiteli pomocí změny povrchových antigenů, rychlé migrace do různých hostitelských tkání, vyhýbání se vznikajícím imunitním reakcím a následně migrovaly do imunoprivilegovaných míst, kde jsou do značné míry chráněny před adaptivní imunitou. Bylo tedy potvrzeno, že potlačení imunitního systému hostitele je přímo spojeno s přítomností IL-10 indukovaným *B. burgdorferi* (Lazarus et al., 2008).

Zvýšená produkce IL-10 u myši C57BL/6 souvisí se sníženou závažností artritidy. Zdá se, že protizánětlivý účinek IL-10 umožňuje myším C57BL/6 minimalizovat zánět produkovaný v reakci na lipoproteiny *B. burgdorferi* v infikovaných kloubních tkáních. Nicméně snížená míra zánětu má pro zvíře i určité negativní důsledky ve formě zvýšeného počtu spirochét

přetrvávajících v těchto tkáních. Myši s deficitem IL-10 mají významně méně spirochét v kloubních tkáních 4 týdny po infekci než myš C57BL/6 divokého typu (Brown et al., 1999).

Imunitní modulační terapie pomocí inhibice kontrolních bodů zaznamenaly v posledním desetiletí působivý růst (Tumeh et al., 2014). Mezi inhibiční kontrolní body patří PD-1, který díky vazbě na svůj ligand PD-L1 reguluje aktivitu T buněk, tlumí zánětlivou odpověď při infekci a zabraňuje tak autoimunitě (Pardoll D. M., 2012). Monoklonální anti-PD-L1 protilátky inhibují vazbu PD-L1 na PD-1 a mohou zvýšit aktivitu T buněk v tomto imunitním kontrolním bodě. V několika klinických studiích byly tyto protilátky úspěšně použity k léčbě malignit, jako je melanom, nemalobuněčný karcinom plic, rakovina hlavy a krku, rakovina ledvinných buněk a další (Diggs & Hsueh, 2017).

V naší studii jsme se zaměřily na sledování specifické proliferace T buněk, které přišly do kontaktu s plazmacytoidními dendritickými buňkami stimulovanými boreliemi. Součástí tohoto úkolu bylo zavedení a optimalizace měření parametrů buněčné proliferace pomocí barviva Cell Trace Violet excitovaného fialovým laserem průtokového cytometru. Jelikož jsme z předchozích experimentů věděly, že borelie stimulují PD-L1, snažily jsme se osu PD-1/PD-L1 zablokovat pomocí monoklonální protilátky anti-PD-L1. Pro porovnání účinků protilátky jsme použily dva časové intervaly působení protilátky (2 a 20 hodin) před přidáním T lymfocytů. Proliferace T buněk byla poté měřena 48 hodin a 120 hodin kokultivace. Jelikož hladina proliferace v intervalu 48 hodin byla velmi nízká, tak jsme se dále zabývaly výsledky pouze z intervalu 120 hodin kokultivace (viz. grafy Obr. 5, 6, 7, 8).

Zásadním sledovaným parametrem byla tzv. frekvence dělivších se buněk. Frekvence dělivších se buněk vyjadřuje podíl původních buněk, které se alespoň jedenkrát během experimentu rozdělily. Statisticky významný pozitivní vliv na proliferaci měla anti-PD-L1 protilátka pouze u CD4⁺ lymfocytů. Podobný trend měl i tzv. index dělení (division index), který označuje průměrný počet buněčných dělení, kterým prošla buňka v původní populaci a zahrnuje i buňky, které se nikdy nerozdělily. Celkově se tedy dá říct, že použití neutralizační anti-PD-L1 protilátky způsobilo, že na prezentované boreliové antigeny reagovalo proliferací více CD4⁺ T buněk. Ačkoliv jsme u těchto buněk přímo nestanovovaly jejich subtyp, je známo, že v nepřítomnosti PD-L1 převažuje u myši odpověď typu Th1 se zvýšenou produkcí IFN- γ (Latchman et al., 2004). Zároveň dostatečná tvorba IFN- γ v erythema migrans snižuje pravděpodobnost chronických/perzistujících symptomů lymeské boreliózy (Sjöwall et al., 2011).

Dvouhodinová preinkubace DC s neutralizační protilátkou proti PD-L1 vedla poté k významnému zvýšení exprese PD-1 na CD4+ i CD8+ T lymfocytech. PD-1 je rychle indukován na T buňkách po jejich aktivaci zprostředkované TCR a tato exprese klesá s tzv. clearance antigenu, zatímco u chronického onemocnění je exprese PD-1 na antigen-specifických T buňkách udržována a je spojena s vyčerpáním T buněk. Zatímco PD-1+ T lymfocyty infiltrující primární nádor vykazovaly nádorovou reaktivitu a jejich adoptivní přenos vedl ke kontrole nádoru příjemce, buňky neexprimující PD-1 takové vlastnosti v myších modelech myelomu a melanomu neměly (Simon & Labarriere, 2017).

Ošetření anti-PDL1 protilátkou nemělo v našem experimentálním designu statisticky signifikantní vliv na produkci IL-2, IL-10 a TGF- β , ale v intervalu 120 hodin je patrný trend ve snížení jak IL-2, tak TGF- β po 20-hodinovém ošetření protilátkou. Tento společný trend by mohl znamenat snížení přítomnosti Tregs. Periferní CD4+ a CD8+ T buňky mohou být také indukovány, aby se staly regulačními T buňkami (Horwitz et al., 2003), a sice pomocí současného působení TGF- β a IL-2, které umožňují vytváření a expanzi Tregs (Tischner et al., 2012).

Dvouhodinové ošetření protilátkou vyústilo v mírné snížení produkce IL-10. Vzhledem k jeho stanovení metodou ELISA nelze říct, které buňky v rámci námi zvoleného experimentálního modelu IL-10 jsou za tento pokles zodpovědné. Je známo, že zablokování dráhy PD-1/PD-L1 pomocí protilátky působí nejen na T lymfocyty, ale pomocí tzv. zpětné signalizace na dendritické buňky. Aktivace intracelulární domény PD-L1 molekuly je nutná ke správné aktivaci kinázy ERK a migraci DC do spádových lymfatických uzlin (Lucas et al., 2020). Zároveň je IL-10 považován za marker supresivních DC, které koexprimují PD-L1 (Llopiz et al., 2017), takže snížení hladiny IL-10 produkovaného dendritickými buňkami by mohlo vyústit ve zlepšení schopnosti DC prezentovat antigen a stimulovat T buňky (Llopiz et al., 2018).

Vzhledem k tomu, že naměřené hodnoty cytokinů IL-2 a TGF- β byly velmi nízké až na hranici detekovatelnosti, je v tomto experimentálním designu třeba expresi cytokinů stanovovat jinou metodou, než je ELISA, např. pomocí kvantitativní qPCR, která umožňuje namnožení původního množství mRNA sledovaného cytokinu ve vzorku. Nejpodstatnější rozdíly se pokusíme ověřit průtokovou cytometrií, která umožňuje přiřadit produkci cytokinů konkrétním buňkám.

Předložená práce shrnuje první výsledky dosažené v rámci plánovaného dlouhodobého projektu zabývajícího se studiem role osy PD-1/PD-L1 a dalších inhibičních kontrolních bodů při infekci způsobené *B. burgdorferi*. Jednotlivé pokusy bude potřeba zopakovat s příslušnými kontrolami, například se splenocyty z boreliemi neinfikované myši a s příslušnou izotypovou kontrolou místo anti-PD-L1 protilátky. Vzhledem ke slibným výsledkům se dále ve výzkumu zaměříme na T regulační lymfocyty, kde budeme sledovat tvorbu myších Tregs v imunologické synapsi mezi dendritickou buňkou aktivovanou spirochétami *B. burgdorferi* a myšími T lymfocyty a poté budeme stanovovat vliv anti-PD-L1 protilátky na indukci Tregs. Hladiny cytokinů budeme pravděpodobně stanovovat na úrovni mRNA pomocí kvantitativní PCR vzhledem k nízkým hladinám cytokinů v buněčných supernatantech. Dále bude v plánu zkoumání role dalších imunitních kontrolních bodů (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT), případně kombinovaná blokáda dvou nebo více kontrolních bodů najednou.

6 Shrnutí

- *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen ATCC® 35211TM) indukují více PD-L1, CD86 a IL-10 než *B. afzelii* (kmen CB43) u neutrofilů.
- Zablokování osy PD-1/PD-L1 pomocí anti-PD-L1 neutralizační protilátky způsobuje zvýšení procenta dělivších se lymfocytů CD4+ po interakci mezi pDC a primovanými T lymfocyty.
- Snížený cytokinový trend u IL-2 a TGF- β po použití anti-PD-L1 protilátky naznačuje možný vliv anti-PD-L1 protilátky na vznik Tregs.
- Výzkum se dále zaměří na T regulační lymfocyty a bude se dále rozvíjet.

7 Seznam použité literatury

Apetoh, L., Smyth, M. J., Drake, C. G., Abastado, J. P., Apte, R. N., Ayyoub, M., Blay, J. Y., Bonneville, M., Butterfield, L. H., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Chen, L., Colombo, M. P., Comin-Anduix, B., Coukos, G., Dhodapkar, M. V., Dranoff, G., Frazer, I. H., ... Anderson, A. C. (2015). Consensus nomenclature for CD8+ T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology*, 4(4), e998538.

Bailly C. (2020). The implication of the PD-1/PD-L1 checkpoint in chronic periodontitis suggests novel therapeutic opportunities with natural products. *The Japanese dental science review*, 56(1), 90–96.

Barnova, M., Bobcakova, A., Urdova, V., Kosturiak, R., Kapustova, L., Dobrota, D., & Jesenak, M. (2021). Inhibitory immune checkpoint molecules and exhaustion of T cells in COVID-19. *Physiological research*, 70(S2), S227–S247.

Berndtson K. (2013). Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *International journal of general medicine*, 6, 291–306.

Bersanelli, M., & Buti, S. (2017). From targeting the tumor to targeting the immune system: Transversal challenges in oncology with the inhibition of the PD-1/PD-L1 axis. *World journal of clinical oncology*, 8(1), 37–53.

Bierwagen, P., Sliwiak, J., Jaskolski, M., & Urbanowicz, A. (2021). Strong interactions between Salp15 homologues from the tick *I. ricinus* and distinct types of the outer surface OspC protein from *Borrelia*. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101630.

Bolz, D. D., & Weis, J. J. (2004). Molecular mimicry to *Borrelia burgdorferi*: pathway to autoimmunity?. *Autoimmunity*, 37(5), 387–392.

Branda, J. A., & Steere, A. C. (2021). Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00018-19.

Brissette, C. A., & Gaultney, R. A. (2014). That's my story, and I'm sticking to it--an update on *B. burgdorferi* adhesins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 41.

- Brown, J. P., Zachary, J. F., Teuscher, C., Weis, J. J., & Wooten, R. M.** (1999). Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infection and immunity*, 67(10), 5142–5150.
- Cardenas-de la Garza, J. A., De la Cruz-Valadez, E., Ocampo-Candiani, J., & Welsh, O.** (2019). Clinical spectrum of Lyme disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 38(2), 201–208.
- Das, S., Suarez, G., Beswick, E. J., Sierra, J. C., Graham, D. Y., & Reyes, V. E.** (2006). Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during *Helicobacter pylori* Infection . *The Journal of Immunology*, 176(5), 3000–3009.
- Diggs, L. P., & Hsueh, E. C.** (2017). Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomarker research*, 5, 12.
- Duraiswamy, J., Kaluza, K. M., Freeman, G. J., & Coukos, G.** (2013). Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Research*, 73(12), 3591–3603.
- Dyck, L., & Mills, K.** (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European journal of immunology*, 47(5), 765–779.
- Elsner, R. A., Hastey, C. J., & Baumgarth, N.** (2015). CD4+ T cells promote antibody production but not sustained affinity maturation during *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection and immunity*, 83(1), 48–56.
- Gade, A., Matin, T., Rubenstein, R., & Robinson, C. A.** (2021). Acrodermatitis Chronica Atrophicans. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Garcia-Monco, J. C., & Benach, J. L.** (2019). Lyme Neuroborreliosis: Clinical Outcomes, Controversy, Pathogenesis, and Polymicrobial Infections. *Annals of neurology*, 85(1), 21–31.
- Horwitz, D. A., Zheng, S. G., & Gray, J. D.** (2003). The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *Journal of leukocyte biology*, 74(4), 471–478.

Hu, L. T., Eskildsen, M. A., Masgala, C., Steere, A. C., Arner, E. C., Pratta, M. A., Grodzinsky, A. J., Loening, A., & Perides, G. (2001). Host metalloproteinases in Lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 44(6), 1401–1410.

Chang, K. C., Burnham, C. A., Compton, S. M., Rasche, D. P., Mazuski, R. J., McDonough, J. S., Unsinger, J., Korman, A. J., Green, J. M., & Hotchkiss, R. S. (2013). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Critical care (London, England)*, 17(3), R85.

Chung Y, Zhang N, Wooten RM (2013) *Borrelia burgdorferi* Elicited-IL-10 Suppresses the Production of Inflammatory Mediators, Phagocytosis, and Expression of Co-Stimulatory Receptors by Murine Macrophages and/or Dendritic Cells. *PLOS ONE* 8(12): e84980.

Kenedy, M. R., Vuppala, S. R., Siegel, C., Kraiczy, P., & Akins, D. R. (2009). CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 77(7), 2773–2782.

Kraiczy P. (2016). Hide and Seek: How Lyme Disease Spirochetes Overcome Complement Attack. *Frontiers in immunology*, 7, 385.

Kung, F., Anguita, J., & Pal, U. (2013). *Borrelia burgdorferi* and tick proteins supporting pathogen persistence in the vector. *Future microbiology*, 8(1), 41–56.

Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F. A., Bower, M., & Pinato, D. J. (2018). PD-L1. *Journal of clinical pathology*, 71(3), 189–194.

Lasky, C. E., Pratt, C. L., Hilliard, K. A., Jones, J. L., & Brown, C. R. (2016). T Cells Exacerbate Lyme Borreliosis in TLR2-Deficient Mice. *Frontiers in immunology*, 7, 468.

Latchman, Y. E., Liang, S. C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R. A., Klemm, M., Kuchroo, V. K., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2004). PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10691–10696.

Lazarus, J. J., Kay, M. A., McCarter, A. L., & Wooten, R. M. (2008). Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infection and Immunity*, 76(3), 1153–1162.

- Llopiz, D., Ruiz, M., Infante, S., Villanueva, L., Silva, L., Hervas-Stubbs, S., Alignani, D., Guruceaga, E., Lasarte, J. J., & Sarobe, P.** (2017). IL-10 expression defines an immunosuppressive dendritic cell population induced by antitumor therapeutic vaccination. *Oncotarget*, 8(2), 2659–2671.
- Llopiz, D., Ruiz, M., Silva, L., & Sarobe, P.** (2018). Enhancement of Antitumor Vaccination by Targeting Dendritic Cell-Related IL-10. *Frontiers in immunology*, 9, 1923.
- Lucas, E. D., Schafer, J. B., Matsuda, J., Kraus, M., Burchill, M. A., & Tamburini, B.** (2020). PD-L1 Reverse Signaling in Dermal Dendritic Cells Promotes Dendritic Cell Migration Required for Skin Immunity. *Cell reports*, 33(2), 108258.
- Majerová, K., Hönig, V., Houda, M., Papežík, P., Fonville, M., Sprong, H., Rudenko, N., Golovchenko, M., Bolfíková, B. Č., Hulva, P., Růžek, D., Hofmannová, L., Votýpka, J., & Modrý, D.** (2020). Hedgehogs, squirrels, and blackbirds as sentinel hosts for active surveillance of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* complex in urban and rural environments. *Microorganisms*, 8(12), 1–16.
- Margos, G., Gofton, A., Wibberg, D., Dangel, A., Marosevic, D., Loh, S. M., Oskam, C., & Fingerle, V.** (2018). The genus *Borrelia* reloaded. *PloS one*, 13(12), e0208432.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H., & Fish, D.** (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(7), 1545–1563.
- Mason, L. M., Veerman, C. C., Geijtenbeek, T. B., & Hovius, J. W.** (2014). Ménage à trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends in parasitology*, 30(2), 95–103.
- Pardoll D. M.** (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264.
- Phillips, B. L., Mehra, S., Ahsan, M. H., Selman, M., Khader, S. A., & Kaushal, D.** (2015). LAG3 expression in active *Mycobacterium tuberculosis* infections. *The American journal of pathology*, 185(3), 820–833.

- Rahimi Kalateh Shah Mohammad, G., Ghahremanloo, A., Soltani, A., Fathi, E., & Hashemy, S. I.** (2020). Cytokines as potential combination agents with PD-1/PD-L1 blockade for cancer treatment. *Journal of cellular physiology*, 235(7-8), 5449–5460.
- Rauer, S., Kastenbauer, S., Fingerle, V., Hunfeld, K. P., Huppertz, H. I., & Dersch, R.** (2018). Lyme Neuroborreliosis. *Deutsches Arzteblatt international*, 115(45), 751–756.
- Sahay, B., Patsey, R. L., Eggers, C. H., Salazar, J. C., Radolf, J. D., & Sellati, T. J.** (2009). CD14 signaling restrains chronic inflammation through induction of p38-MAPK/SOCS-dependent tolerance. *PLoS pathogens*, 5(12), e1000687.
- Simon, S., & Labarriere, N.** (2017). PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?. *Oncoimmunology*, 7(1), e1364828.
- Sjöwall, J., Fryland, L., Nordberg, M., Sjögren, F., Garpmo, U., Jansson, C., Carlsson, S. A., Bergström, S., Ernerudh, J., Nyman, D., Forsberg, P., & Ekerfelt, C.** (2011). Decreased Th1-type inflammatory cytokine expression in the skin is associated with persisting symptoms after treatment of erythema migrans. *PloS one*, 6(3), e18220.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W., Li, X., & Mead, P. S.** (2016). Lyme borreliosis. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16090.
- Strle, K., Shin, J. J., Glickstein, L. J., & Steere, A. C.** (2012). Association of a toll-like receptor 1 polymorphism with heightened Th1 inflammatory responses and antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 64(5), 1497–1507.
- Thompson, D., Watt, J. A., & Brissette, C. A.** (2021). Host transcriptome response to *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101638
- Tischner, D., Wieggers, G. J., Fiegl, H., Drach, M., & Villunger, A.** (2012). Mutual antagonism of TGF-beta and Interleukin-2 in cell survival and lineage commitment of induced regulatory T cells. *Cell death and differentiation*, 19(8), 1277–1287.
- Tracy, K. E., & Baumgarth, N.** (2017). *Borrelia burgdorferi* Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts. *Frontiers in immunology*, 8, 116.

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., Tomasic, G., ... Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), 568–571.

Vivarelli, S., Falzone, L., Torino, F., Scandurra, G., Russo, G., Bordonaro, R., Pappalardo, F., Spandidos, D. A., Raciti, G., & Libra, M. (2021). Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *International journal of oncology*, 58(2), 145–157.

Wang, L. L., Li, Z. H., Hu, X. H., Muyayalo, K. P., Zhang, Y. H., & Liao, A. H. (2017). The roles of the PD-1/PD-L1 pathway at immunologically privileged sites. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 78(2), 10.1111/aji.12710.

Wang, Z., Li, G., Dou, S., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Li, G., Hou, C., Wang, R., Shen, B., & Han, G. (2020). Tim-3 Promotes *Listeria monocytogenes* Immune Evasion by Suppressing Major Histocompatibility Complex Class I. *The Journal of infectious diseases*, 221(5), 830–840.

Wen, S., Wang, F., Ji, Z., Pan, Y., Jian, M., Bi, Y., Zhou, G., Luo, L., Chen, T., Li, L., Ding, Z., Abi, M. E., Liu, A., & Bao, F. (2020). Salp15, a Multifunctional Protein From Tick Saliva With Potential Pharmaceutical Effects. *Frontiers in immunology*, 10, 3067.

Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248, 201

8 Použité zkratky

ACA – Acrodermatitis chronica atrophicans

APC – Antigen-presenting cell

BBK32, BB0347 – Fibronectin binding proteins

BOFES – Bovine Fetal Serum

BSK-H – Modifikace BSK média

C57BL/6N – Inbrední kmen laboratorních myší z Charles River Laboratories

CB43 – Označení českobudějovického kmene *Borrelia afzelii*

CD – Cluster of differentiation

Csp – The circumsporozoite protein

CTL – Cytotoxic T lymphocyte

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

DC – Dendritic cells

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay,

EM – Erythema migrans

FH – Factor H

FHL-1 – FH-like protein 1

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

GEC – Gastric epithelial cells

HIV – Human immunodeficiency virus

IFN – Interferon

Ig – Immunoglobulin

IL – Interleukin

IVC – Individually ventilated cages

LAG-3 – Lymphocyte Activation Gene-3

MEM – Minimal essential medium

MHC – Major histocompatibility complex

NLRs – NOD-like receptors

Osp – Outer surface protein

Pamps – Pathogen-associated molecular patterns

PBS – Phosphate-buffered saline

PD-1 – Programmed cell death 1

PD-L1 – Programmed cell death 1 ligand 1

PD-L2 – Programmed cell death 1 ligand 2

PTLDS – Post-treatment lyme disease Syndrome

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction

RNA – Ribonucleic acid

TCC – Terminal complement complex

TCR – T cell receptor

TGF – Transforming growth factor

TIGIT – T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains

TIL – A type of immune cell that has moved from the blood into a tumor

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

TLRs – Toll-like receptors

TNF – tumor necrosis factor

Tregs – Regulatory T cells

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VlsE – Variable major protein-like sequence, expressed