

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra medicínské biologie**



**Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na antivirový účinek  
interferonů**

**Bakalářská práce**

**Vypracovala: Jana Širmarová**

**Školitel: doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.**

**Školitelka specialista: Mgr. Jaroslava Liesková, Ph.D.**

**České Budějovice 2010**

Širmarová J., 2010: Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na antivirové účinky interferonů [The influence of *Ixodes ricinus* saliva on the antiviral effects of interferons, Bc. Thesis, in Czech]

Annotation:

We investigated the influence of the saliva from *Ixodes ricinus* tick on antiviral effect of interferons. In addition, the effect of tick saliva on the cellular signalling pathways stimulated by IFN  $\beta$  and IFN  $\gamma$  was examined.

Tato práce byla financována granty:

MŠMT: Centrum základního výzkumu LC06009  
GA AV ČR IAA600960811

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 27. dubna 2010

.....  
Jana Širmarová

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za podporu a čas, který mi věnoval. Velký dík patří také mé školitelce specialistece Mgr. Jaroslave Lieskovské, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při vysvětlování dané problematiky. Děkuji paní Evě Řezníčkové a Evě Výletové za trpělivost a ochotu mi kdykoliv pomoci. Samozřejmě nesmím zapomenout poděkovat svým rodičům a přátelům, kteří mě po celou dobu podporovali.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Účinky klíštěcích slin.....	1
1.2. Interferon (IFN).....	2
1. 2. 1. IFN Typu I, II a jejich receptory .....	3
1. 2. 2. Signální dráhy IFN typu I a IFN typu II .....	4
1. 2. 2. 1. Jak/Stat signální dráha.....	4
1. 2. 2. 2. PI3K/Akt signální dráha.....	6
1.3. Virus myší encefalomyokarditidy (EMCV).....	7
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>9</b>
3. 1. Buněčné linie.....	9
3. 2. Interferony, inhibitor PI3K a virus .....	9
3. 3. Odběr klíštěcích slin .....	10
3. 3. Plaková titrace.....	10
3. 5. Vliv slin klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> na antivirový účinek IFN $\beta/\gamma$ .....	11
3. 6. Působení slin na L929 buňky ovlivněné IFN $\beta$ a IFN $\gamma$ .....	11
3. 7. SDS – PAGE za redukčních podmínek .....	12
3. 7. Western blot .....	12
3. 7. ECL detekce .....	13
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>14</b>
4. 1. Porovnání antivirového účinku IFN $\beta$ a IFN $\gamma$ .....	14
4. 2. Vliv slin klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> na replikaci EMCV .....	17
4. 3. Vliv klíštěcích slin na antivirový účinek IFN $\gamma$ a IFN $\beta$ .....	18
4. 4. Vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah důležitých pro antivirový účinek IFN.....	20
4. 5. Vliv farmakologického inhibitoru fosfatidylinositol-3 kinázy na antivirový účinek IFN $\beta$ a IFN $\gamma$ .....	21
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Souhrn</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Seznam literatury</b> .....	<b>26</b>

# 1. Úvod

Klíšťata jsou krev sající ektoparazité, kteří přenášejí řadu patogenů včetně viru klíšťové encefalitidy a spirochét Lymeské boreliózy (Cupp, 1991). Klíšťata a jimi přenášené patogeny stimulují imunitní systém hostitele. Tento vzájemný vztah mezi hostitelem a klíštětem je důležitý v biologii klíštěte a stejně tak v přenosu patogenů. Klíšťata si vyvinula protiopatření, jimiž jsou schopná obejít imunitní systém hostitele (Brossard a Wikel, 2004).

Významnou roli při přenosu patogenů sehraávají klíštěcí sliny, které obsahují komplex imunogenů a farmakologicky aktivních látek, které modulují imunitní odpověď hostitele ve prospěch sání klíštěte (Wikel a kol, 1994). Imunomodulační aktivita klíštěcích slin působí jak proti přirozené tak i získané (adaptivní) imunitní odpovědi hostitele (Nuttall, 1998). Jedním ze základních mechanismů přirozené imunity při virové infekci je produkce interferonu, který působí autokrinně (na stejnou buňku, jenž ho sekretovala) a parakrinně (na sousední buňku). Inhibiční účinek klíštěcích slin vůči interferonu byl prokázán (Hajnická a kol, 2000), ale mechanismus zůstává neobjasněn.

## 1.1. Účinky klíštěcích slin

Imunosupresivní proteiny v klíštěcích slinách a extraktu slinných žláz (SGE) byly částečně charakterizovány (Wikel, 1999). Ve slinách jsou obsaženy bioaktivní molekuly, které potlačují imunitní děje různými mechanismy; inhibují aktivaci komplementu, snižují T-buněčnou proliferaci a tvorbu cytokinů makrofágy a Th1 lymfocyty. Dalším mechanismem účinku klíštěcích slin je neutralizace buněčné komunikace navázáním specifických molekul slin k cytokinům, které mají důležitou roli v přirozené i získané imunitě. Anti-cytokinová aktivita klíštěcích slin a extraktu slinných žláz (SGE) závisí na druhu klíštěte, vývojovém stádiu (dospělec, nymfa), množství použitého SGE a počtu dnů sání klíštěte (Hajnická a kol, 2005, Vančová a kol, 2009).

Působení klíštěcích slin snižuje hladinu chemokinu interleukinu 8 (IL-8) a inhibuje navázání IL-8 k jeho receptorům na lidských granulocytech (Hajnická a kol, 2001). Bylo také prokázáno, že sliny klíštěte inhibují antivirový účinek myšího IFN  $\alpha/\beta$  (Hajnická a kol, 2000).

Sliny získané z *Ixodes ricinus* výrazně potlačují produkci IFN  $\gamma$  myšími splenocyty stimulovanými lipopolysacharidem (LPS) zatímco produkci interleukinu 10 (IL-10) zvyšují v porovnání s buněčnou kulturou neošetřenou slinami (Kopecký a kol, 1999). Dalším důležitým účinkem slin je inhibice alternativní cesty komplementu zodpovídající za přirozenou imunitní odpověď (Lawrie a kol, 1999). Byl prokázán supresivní účinek slin na aktivitu NK buněk stimulovaných LPS a částečný inhibiční účinek na produkci NO produkovaného kulturou myších makrofágů (Kopecký a Kuthejlová, 1998). Sliny získané z *Rhipicephalus sanguineus* inhibovaly diferenciaci dendritických buněk a způsobily pokles populace diferencovaných nezralých dendritických buněk (Cavassani a kol, 2005).

Klíštěcí sliny hrají centrální roli v neviremickém přenosu virů z infikovaných na neinfikovaná klíšťata, která společně sají na stejném obratlovci, v jehož krvi nebyla zjištěna přítomnost viru (Jones a kol, 1992). Jev, nazývaný slinami aktivovaný přenos (saliva activated transmission) – SAT efekt, je předpokládaným výsledkem imunomodulačních účinků klíštěcích slin v místě, kde je klíště přichyceno. Poprvé byl SAT efekt popsán u přenosu Togoto viru (Nuttall a Jones, 1991). Přímý důkaz SAT účinku byl demonstrován zvýšenou infekčností, pokud byl patogen spolu s SGE aplikován do hostitele, než když byl patogen aplikován bez SGE (Nuttall a Labuda, 2004).

Imunomodulační faktory brání obratlovcovi, aby vyvinul imunitní odpověď postihující klíště. Tyto proteiny tedy usnadňují sání krve a protože je jejich vliv na imunitu nespecifický, zvyšují i přenos patogenů (Gillespie a kol, 2000).

## 1.2. Interferon (IFN)

Interferony patří do rodiny cytokinů. Mají antivirové a buněčný růst potlačující účinky. Tyto cytokiny jsou v první obranné linii proti virové infekci a hrají důležitou roli ve stálém dohledu nad maligními buňkami.

Interferon je syntetizován buňkami jako odpověď na vnější podnět například virovou infekci. Výsledkem působení interferonu je navození antivirového stavu (Stark a kol, 1998). Na základě svých biologických vlastností jsou interferony využívány v léčbě různých onemocnění, jenž zahrnují například nádorové onemocnění, virovou infekci, autoimunitní poruchy (Parmar a Plataniás, 2003).

## 1. 2. 1. IFN Typu I, II a jejich receptory

Interferony se klasifikují do dvou hlavních skupin: typ I a typ II.

K interferonům typu I se řadí IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$ , IFN  $\delta$ , IFN  $\epsilon$ , IFN  $\kappa$ , IFN  $\tau$  a IFN  $\omega$ . IFN  $\alpha$  / $\beta$  je sekretován virem infikovanými buňkami. IFN  $\alpha$  je produkován leukocyty a IFN  $\beta$  fibroblasty (Pestka a kol, 2004).

Jediným zástupcem typu II je IFN  $\gamma$ . IFN  $\gamma$  je nejvíce produkován aktivovanými NK buňkami (angl. natural killer). U NK buněk je jeho produkce podporovaná cytokiny, jež jsou produkovány makrofágy, zvláště TNF  $\alpha$  (angl. tumor necrosis factor) a IL-12 (Trinchieri, 1995). Dále je IFN  $\gamma$  produkován aktivovanými Th buňkami a aktivovanými CD8<sup>+</sup> cytotoxickými buňkami (Chan a kol, 1991). Antivirový účinek IFN  $\gamma$  je zčásti zprostředkován jeho schopností vyvolat Th1 imunitní odpověď jako je například produkce cytotoxických T lymfocytů, jež jsou důležité pro zničení infikovaných buněk (Biron, 1998).

Oba typy interferonů se podílí na schopnosti zvýšit expresi MHC I proteinů a tím podpořit CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď. Ale jen IFN  $\gamma$  je schopen navodit expresi MHC II proteinů na buňkách a tím zvýšit CD4<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď (Boehm a kol, 1997).

Skrze receptory umístěné na povrchu buněk mohou interferony vykonávat své funkce. Receptory jsou druhově specifické. Je znám receptor pro interferon typu I (IFNAR) a receptor pro interferon typu II (IFNGR).

Interferony typu I mají společný receptor skládající se ze dvou podjednotek IFNAR1 (IFNR $\alpha$ ) a IFNAR2 (IFNR $\beta$ ). Receptory se tvoří na všech buňkách včetně maligních hematopoetických buňkách. (Colamonici a kol, 1992).

Geny pro obě podjednotky receptoru interferonů typu I jsou lokalizovány u člověka na chromozomu 21 a u myši na chromozomu 16. IFNAR1 je protein, který má jednotnou formu a jeho relativní molekulová hmotnost je 110–130 kDa. IFNR1 je v transmembránové oblasti. Spolu s dlouhou formou IFNAR2 tvoří počátek Jak (Janus aktivovaných kináz)/Stat (signal transducers and activators of transcription) signální dráhy (Domanski a kol, 1995).

IFNAR2 obsahuje dlouhou formu IFNRAR2c, krátkou IFNRAR2b a rozpustnou formu IFNRAR2a. IFNRAR2c je protein mající relativní molekulovou hmotnost 90–100 kDa. Ukázalo se, že tato forma je také funkční částí receptoru IFN typu I.

IFNAR2b má hmotnost 51 kDa (Lutfalla a kol, 1995). Dlouhá a krátká forma podjednotky IFNAR2 jsou identické v extracelulární a transmembránové oblasti. Stejných mají i prvních 16 aminokyselin v cytoplasmatické oblasti. Poté od tohoto místa jsou celkově odlišné, IFNAR2b je v této oblasti kratší (Novick a kol, 1994).

IFN typu II má receptory, které jsou vytvářeny na téměř všech typech buněk s výjimkou zralých erytrocytů. Receptory pro IFN typu II se vyznačují druhovou specifitou. Funkčně aktivní receptory pro IFN  $\gamma$  jsou složeny ze dvou podjednotek: IFNGR1 (IFNG $\alpha$ ) a IFNGR2 (IFNG $\beta$ ). IFNGR1 je hlavní podjednotka vázající ligand (IFN  $\gamma$ ). IFNGR1 o relativní molekulové hmotnosti 90 kDa je kódovaný geny na chromozomu 6 u člověka a na chromozomu 10 u myši. Tato podjednotka hraje důležitou roli v proniknutí ligandu do buňky a v přenosu signálu (Bach a kol, 1997).

IFNGR2 je glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 61–67 kDa u člověka a 60–65 kDa u myši. Je kódován geny na chromozomu 21 u člověka a na chromozomu 16 u myši. IFNGR2 hraje menší roli ve vázání ligandu, ale je vyžadován pro signální dráhu IFN  $\gamma$  (Muller a kol, 1994).

## **1. 2. 2. Signální dráhy IFN typu I a IFN typu II**

Po navázání IFN na jeho receptor se aktivuje několik signálních drah. Hlavní signální dráhou je Jak/Stat. Kinázy Janus rodiny (angl. **J**anus **a**ctivated **k**inase — Jak) a transkripční faktory Stat (angl. **s**ignal **t**ransducer and **a**ctivators of **t**ranscription) se společně podílí na této signální dráze, která přenáší informaci obdrženou od navázaného IFN. Signál se skrze receptory přenáší k promotorům příslušných genů v jádře (Darnell a kol, 1994). Souběžně s touto dráhou se paralelně aktivuje fosfatidylinositol-3 kináza (PI3K).

### **1. 2. 2. 1. Jak/Stat signální dráha**

Spojením IFN  $\alpha/\beta$  s jeho receptorem je vyvolána rychlá aktivaci enzymů Jak1 a Tyk2 (tyrosin kináza 2). Tyk2 je vázán na podjednotku receptoru IFNAR1 a Jak1 se pojí s podjednotkou IFNAR2, konkrétně s její dlouhou formou IFNAR2c. Aktivované Jak kinázy fosforylují obě podjednotky receptoru typu I a umožňují tím vazbu Stat proteinů, jež jsou následně fosforylovány a tím aktivovány.

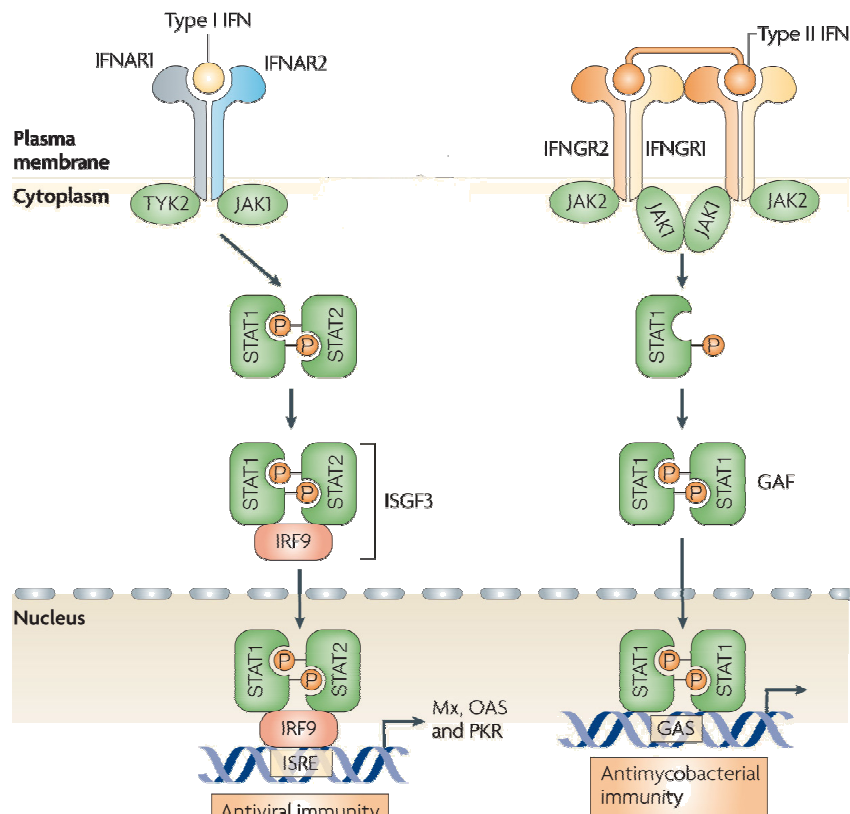
Stat proteiny zahrnují Stat1, Stat2, Stat3 a Stat5 (Darnell, 1994). Stat1 a Stat2 spolu vytváří heterodimer, který se spojuje s p48 (protein známý také jako IFR-9 – IFN regulační faktor). Toto spojení dává vznik ISGF3 (interferonem stimulovaný genový faktor 3) komplexu. Takto vzniklý trimer se přemisťuje do jádra, aby inicioval genovou transkripci z promotoru obsahující sekvenci interferonem stimulovaných odpovídajících jednotek (angl. **interferon stimulated response elements – ISRE**) (Darnell, 1997).

Další fosforylované a aktivované Stat proteiny vytváří homodimery (Stat1:1, Stat3:3 a Stat5:5) a heterodimer (Stat1:3), které aktivují transkripci interferonem stimulovaných genů, ale z promotoru obsahujícího gama aktivovanou sekvenci (angl. **gamma activated sequence – GAS**) (Darnell, 1997). Stat4 a Stat6 mohou být také aktivovány IFN typu I, ale jen u určitých typů buněk a to buněk endotelového či lymfoidního typu (Torpey a kol, 2004).

V případě IFN  $\gamma$  se po navázání na jeho receptor aktivují kinázy Jak1 a Jak2 a tím dochází k vytvoření vazebného místa pro Stat1. Stat1 se aktivuje tyrosinovou fosforylací a vytváří homodimer Stat1:1, který je přemístěn do jádra, kde je schopen se vázat na promotorovou gama aktivovanou sekvenci (GAS) a iniciovat transkripci příslušného genu (Bach a kol, 1997). Schéma signálních drah IFN typu I a II viz. Obr. 1.1.

Vnitrobuněčná signalizace je důležitá pro regulaci, kontrolu růstu a homeostázu u mnohobuněčných organismů. Jak/Stat signální dráha může být narušena vlivem různých činitelů, což má pak za následek nedostatečnou funkci IFN. V nepřítomnosti Stat1, který je důležitou součástí obou signálních drah IFN  $\alpha/\beta$  a IFN  $\gamma$ , nebyl navozen antivirový stav, který potřebuje plně fosforylovaný Stat1 (Horvath a Darnell, 1996). Bylo ukázáno, že virus spalniček inhibuje odpověď IFN přímým zabráněním funkce Stat proteinů. Expres proteinu V tohoto viru brání navození transkripce IFN  $\alpha/\beta$  a IFN  $\gamma$  (Palosaari a kol, 2003).





**Obr. 1.1.** Schéma signální dráhy IFN typu I a typu II (Sadler a Williams, 2008).

IFN typu I se naváže na receptor typu I. IFN typu II se váže k receptoru typu II. Navázáním na receptory se aktivují Jak kinázy, ty následně fosforylují Stat proteiny, ty vytváří homodimery (IFN typ II) a heterodimery (IFN typ I). Heterodimer Stat1:2 je spojen s IRF9 a dohromady tvoří trimer (ISGF3). Homodimer Stat1:1 je formován do aktivní formy **gamma activated factor** – GAF. Oba transkripční faktory jsou přemístěny do jádra, kde stimulují IFN stimulované geny ze dvou sekvencí promotorů ISRE a GAS.

### 1. 2. 2. 2. PI3K v signální dráze IFN typu I a IFN typu II

Fosfatidylinositol-3 kináza (angl. **phosphatidylinositol-3 kinase** – PI3K) patří k lipidovým kinázám, které se podílí na mnoha fyziologických dějích a to na růstu buněk, proliferaci, schopnosti přežít, transportu glukózy a přestavbě cytoskeletu. Aktivovaná PI3K aktivuje několik efektorů, vykonávajících fyziologické účinky této kinázy. Jedním z těchto efektorů je serin-threoninová kináza (Akt), která je zodpovědná za antiapoptický účinek. PI3K je tvořena dvěma podjednotkami, katalytickou p110 a regulační p85 (Uddin a kol, 2000).

Interferony typu I využívají k aktivaci PI3K kináz insulinové receptorové substráty (IRS). Aktivace IRS je zprostředkována kinázami Jak1 a Tyk2 (Burfoot a kol, 1997).

V případě IFN typu II není aktivace PI3K zprostředkovávaná přes IRS, ale je přímo aktivovaná kinázami Jak1 a Jak2, tyto kinázy aktivují PI3K fosforylací tyrosinového zbytku a následně je aktivována Akt. Efektorová Akt přispívá k aktivaci transkripčního faktoru tvořeného Stat1:1 dimerem a to fosforylací serinového zbytku na Stat1 proteinu (Nguyen a kol, 2001).

Pro plně funkční transkripci ISREs je požadována i přítomnost další signální dráhy a to p38 Map kinázy (angl. **mitogen activated protein kinase**) (Uddin a kol, 1999).

### **1.3. Virus myší encefalomyokarditidy (EMCV)**

EMCV je ss-RNA vir, který je řazen do čeledi *Picornaviridae* a rodu *Cardiovirus*. Infekce tímto virem vyvolává onemocnění u domestikovaných prasat (Seaman a kol, 1986), primátů (Jones a kol, 2004), dobytka (Spadbrow a kol, 1970), hlodavců (Wells a kol, 1989) a slonů (Grobler a kol, 1995). Onemocnění je většinou fatální. EMCV postihuje především zvířata žijící v zajetí, jako jsou zoo (Reddacliff a kol, 1997), vepřiny a výzkumná centra. Výskyt EMCV viru u lidí a domestikovaných zvířat je velmi vzácný, ale přece jen byla zaznamenána onemocnění u lidí, které se projevovalo horečkou, blouzněním, bolestmi hlavy a ztuhlostí krku (Gajdusek, 1955). I v poslední době byly zaznamenány případy onemocnění člověka tímto virem (Oberste a kol, 2009).

EMCV je vysoce citlivý k účinku interferonu a proto se využívá v biologickém testu na interferon (Kramer a kol, 1983).

## 2. Cíle práce

- Vliv klíštěcích slin na replikaci viru encefalomyokarditidy (EMCV) .
- Vliv klíštěcích slin na antivirový účinek IFN  $\gamma$  a IFN  $\beta$ .
- Studium vlivu klíštěcích slin na signální dráhy IFN  $\gamma$  a IFN  $\beta$ .

## 3. Materiál a metody

### 3. 1. Buněčné linie

**L929** – buněčná linie derivována z L-buněk (Earle a kol, 1943). L929 jsou myší podkožní fibroblasty, které byly ošetřeny 3-methylcholantrenem a klonovány (Sanford a kol., 1948). Buňky byly kultivovány v médiu Eagle MEM (Sigma) s 5% prekolostrálním telecím sérem (PTS) a 1% antibiotiky a antimykotiky (ATB) (PAA) a 1% glutaminem (PAA) při 37°C. Pasážování bylo prováděno suchou trypsinizací.

**VERO** – buněčná linie derivována z fibroblastů opičí ledviny (Hopps a kol, 1963). Buňky byly kultivovány v médiu L-15 (Leibovitz) (Sigma) s 5% PTS, 1% ATB a 1% glutaminu při 37°C. Pasážování prováděno suchou trypsinizací.

### 3. 2. Interferony, inhibitor PI3K a virus

**IFN  $\beta$**  – rekombinantní myší IFN  $\beta$ , jehož specifická aktivita je  $1,23 \times 10^6$  U/mg (pbl interferon source). Byly používány alikvóty o koncentraci 1000U/ $\mu$ l.

**IFN  $\gamma$**  – rekombinantní myší IFN  $\gamma$  (RD systems), jehož ED<sub>50</sub> (efficiency dose) = 1 ng/ml (RD systems), 1 ng = 1U. Byly používány alikvóty IFN  $\gamma$  o koncentraci 5 ng/ $\mu$ l.

**LY294002** – inhibitor fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) (Sigma-Aldrich). Byly používány alikvóty o 10 mM koncentraci.

Virus myší encefalomyokarditidy (EMCV) byl pomnožen na VERO buňkách a uložen při -70°C. (titr cca  $10^7$  PFU/ml).

### 3. 3. Odběr klíštěcích slin

Klíšťata *Ixodes ricinus* sála na morčeti po dobu 6-ti dní. Nasáté samice klíšťat byly připevněny pomocí oboustranné lepicí pásky k podložním sklíčkům. Na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena skleněná kapilára, která se zafixovala pomocí modelíny. Na hřbetní část těla jim bylo aplikováno po 2  $\mu$ l 5% roztok pilokarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) v 95% ethanolu. Takto připravená klíšťata se umístila do vlhké komůrky, kde byla inkubována po dobu 2 hodin při 37°C; 3,5 % CO<sub>2</sub>. Za daný čas klíšťata vyprodukovala sliny v objemu 2–10  $\mu$ l.

Obsah proteinů ve slinách byl stanoven na 478  $\mu$ g/ml pomocí metody podle Bradfordové pro stanovení koncentrace proteinů (souprava BioRad, Bradford, 1976). Odběr slin byl prováděn metodou podle Valenzuela a kol, (2000). Sliny byly uchovány při teplotě -70°C.

Klíšťata pro odběr slin pocházela z volné přírody z oblasti Českých Budějovic. Byla odchytávána metodou vlnkování. Před pokusy byly sliny filtrovány, čímž bylo zabráněno přítomnosti spirochét Lymeské boreliózy.

### 3. 4. Plaková titrace

Pro vyjádření titrů v plakotvorných jednotkách (PFU, angl. Plaque forming units) byla použita metoda plakové titrace (de Madrid a Porterfield, 1969). Byly použity 24-jamkové panely (TPP, Švýcarsko), do nichž byly naředěny testované vzorky desítkovým ředěním v kultivačním médiu. V každé jamce bylo 200  $\mu$ l ředěného vzorku. Titrovalo se na VERO buňkách. Do každé jamky bylo přidáno 300  $\mu$ l buněčné suspenze VERO buněk v množství 1,2 x 10<sup>5</sup> buněk na jamku (koncentrace 4 x 10<sup>5</sup> buněk/ml). Obsah panelu byl promíchán. Po uplynutí 4–5 hodin byl přidán přeliv po 400  $\mu$ l na jamku. Přeliv byl roztok 3% karboxymethylcelulózy (CMC) a 2x koncentrovaného L15 kultivačního média v poměru 1:1. Vše bylo inkubováno po dobu tří dnů při 37°C v atmosféře 0,5% CO<sub>2</sub>.

Panely byly promyty fyziologickým roztokem (0,9% roztok NaCl) a poté obarveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové; 13,5 g octanu sodného a doplněno do 1 l H<sub>2</sub>O). Na základě toho bylo možné stanovit počet vytvořených plaků.

### **3. 5. Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na antivirový účinek IFN $\beta/\gamma$**

Suspenze buněk L929 byla přidána v množství  $4 \times 10^4$  buněk na jamku (koncentrace  $2 \times 10^5$  buněk/ml) v objemu 200  $\mu$ l do 96-ti jamkového panelu (TPP, Švýcarsko). Druhý den byly buňky inkubovány v duplikaci se slinami v konečné koncentraci 10  $\mu$ g/ml a s interferony v konečné koncentraci 10U IFN  $\gamma$  nebo 1U IFN  $\beta$  v kultivačním médiu (MEM). Byly provedeny různé kombinace buněk, interferonů a slin:

- I. IFN  $\gamma$  nebo IFN  $\beta$  2,5 hodiny před virovou infekcí.
  - II. Sliny 4,5 hodiny před virovou infekcí.
  - III. Sliny 4,5 hodiny před infekcí a IFN  $\gamma$  nebo IFN  $\beta$  2,5 hodiny před virovou infekcí.
  - IV. Inhibitor PI3K – LY294002 (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1  $\mu$ mol/l přidán na 30 minut před infekcí a IFN  $\gamma$  nebo IFN  $\beta$  2,5 hodiny před virovou infekcí.
- Před infekcí bylo kultivační médium odmyto a byl přidán EMCV 25 PFU/ml v objemu 200  $\mu$ l na jamku.

Inokulum viru bylo po 1 hodině adsorpce virionů odsáto a buňky byly promyty 2x po sobě kultivačním médiem bez séra. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l čerstvého kultivačního média do každé jamky. Vzorky kultivačního média byly odebírány po 50  $\mu$ l v intervalech 24h a 48h po infekci v duplikaci. Odebraný objem byl nahrazen stejným objemem čerstvého kultivačního média.

Titř viru byl stanoven plakovou titrací na VERO buňkách.

### **3. 6. Působení slin na L929 buňky ovlivněné IFN $\beta$ a IFN $\gamma$**

Buňky v množství  $5 \times 10^5$  buněk na jamku byly založeny v objemu 1 ml do jamek 24–jamkového panelu (TPP, Švýcarsko).

Druhý den bylo kultivační médium odsáto a buňky byly inkubovány se slinami o koncentraci 20  $\mu$ g/ml ve výsledném objemu 250  $\mu$ l na jamku po dobu 2,5 hodiny (37°C a 0,5% CO<sub>2</sub>). Poté byly k buňkám přidány IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$  o koncentracích 5U/ml po 50  $\mu$ l na jamku a inkubovány 30 minut (37°C a 0,5% CO<sub>2</sub>). V tomto experimentu byly použity jiné koncentrace IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$  a jiná koncentrace slin, protože se jednalo o jiný pokus a proto byla pro něj námi stanovena jednotná koncentrace obou interferonů na 5U/ml a koncentrace slin na 20  $\mu$ g/ml.

### **3. 7. SDS – PAGE (dodecylsírán sodný – polyakrylamidová gelová elektroforéza) za redukčních podmínek**

#### Příprava proteinového lyzátu:

Buňky byly opláchnuty roztokem fosfátů pufovaného fyziologického roztoku (PBS, angl. phosphate buffer saline). Poté byly buňky lyzovány ve 100 ml RIPA pufru (1% Nonidet P-40; 0,25% deoxycholát sodný, 1mM EGTA, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7,5)). K množství  $5 \times 10^5$  buněk na jamku bylo přidáno 100 $\mu$ l RIPA pufru.

Do RIPA pufru byly před jeho použitím přidány inhibitory proteáz (10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1mM fenylmethylsulfonyl fluorid, 1  $\mu$ g/ml pepstatin) a inhibitory fosfatáz (25 mM fluorid sodný (NaF, Sigma), 2 mM ortovanadičnan sodný (Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, Sigma)). RIPA pufr s přidávanými inhibitory byl na buňkách ponechán 5 minut na ledu. Následně byly zlyzované buňky centrifugovány po dobu 10-ti minut při 11 000 rpm a 4°C.

Supernatant byl smíchán se 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrům (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% glycerol, 5% SDS, 0,005% bromfenolová modř) v poměru 3:1 (Laemmli, 1970). K Laemmliho vzorkovacímu pufru byl přidán dithiotreitol (DTT, Sigma) o 0,1M koncentraci. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 95°C. Vzorky o objemu 30  $\mu$ l byly naneseny na 7,5% polyakrylamidový gel a separovány v elektroforetické aparatuře (Amersham Biosciences) v elektroforetickém pufru podle Laemmliho. Separace proteinů probíhala po dobu 45minut, při 40mA a 200V (pro jeden gel).

### **3. 8. Western blot**

Byly použity tyto roztoky a pufry:

transferový pufr (20% methanol; 2,5mM Tris; 0,2M glycin)

1x TBS (Trisem pufovaný fyziologický roztok, angl. Tris buffered saline; 50mM Tris-Cl; 0,9% NaCl; pH 7,6)

blokovací pufr (1x TBS; 0,1% Tween 20 (Sigma) a 5% nízkotučné mléko)

promývací pufr (1x TBS; 0,1% Tween 20 (Sigma))

3% roztok BSA (1x TBS; 0,1% Tween 20 (Sigma), 3% hovězí sérový albumin (BSA, Sigma))

Separované proteiny byly z gelu přeneseny na polyvinyllovou membránu (PVDF, Thermo Scientific) podle Towbinovy metody, založené na principu elektroforetického přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (Towbin a kol, 1979). Přenos probíhal v transferového pufru po dobu 90-ti minut při 70V a 250mA. Membrána byla poté blokována po dobu 1 hodiny v blokovacím pufru. Blot byl 3x promyt v 5-ti minutových intervalech v promývacím pufru. Poté byl inkubován s primárními králičími protilátkami rozeznávajícími fosforylovanou formu na tyrosinovém zbytku proteinu Stat1, pSTAT1 (Y701) (Cell Signalling) a fosforylovanou formu na serinovém zbytku proteinu Akt, pAkt (S473) (Cell Signalling). Primární protilátky byly ředěny v poměru 1:1000 s 3% roztokem BSA a inkubovány přes noc při 4°C.

Druhý den byl blot 3x promyt v 5-ti minutových intervalech v promývacím pufru. Následovala inkubace blotu se sekundárními anti-králičími protilátkami IgG značenými křenovou peroxidázou (HRP – angl. Horseradish peroxidase, Cell Signalling), které byly ředěny v poměru 1:2000 s 3% roztokem BSA po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Membrána byla následně 3x promyta v 5-ti minutových intervalech v promývacím pufru.

### **3. 9. ECL detekce**

Proteiny byly vizualizovány chemiluminiscenční metodou. Jako substrát byl použit roztok peroxidu (Thermo Scientific), který byl smíchán se substrátovým roztokem luminolu (Thermo Scientific) v poměru 1:1 a aplikován na membránu 200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  po dobu 1 minuty.

Samotný signál byl detekován ve Fuji Film Dark Intelligent Box Las-3000 Lite Image Reader a kvantitativně vyhodnocen pomocí softwarového programu ImageJ.

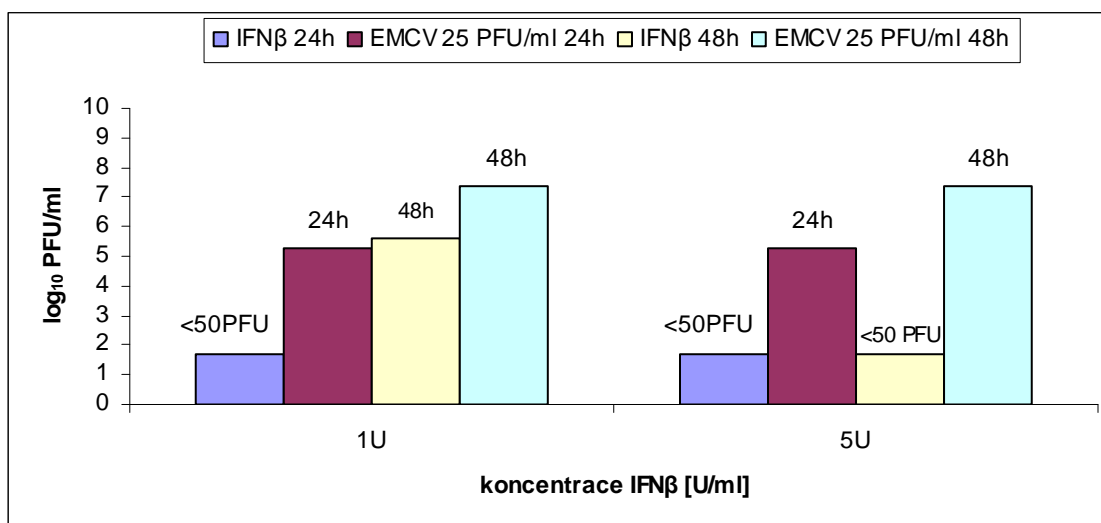


## 4. Výsledky

### 4. 1. Porovnání antivirového účinku IFN $\beta$ a IFN $\gamma$

Před porovnáním antivirového účinku interferonů, bylo nutné stanovit vhodný titr viru a množství IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$ , které je potřebné, aby byl navozen antivirový stav. Pro testování replikace viru byl použit EMCV, který se replikoval v buněčné linii L929. Byly použity infekční dávky EMCV 25 PFU/ml a 250 PFU/ml. Účinek IFN na replikaci viru byl vyhodnocen ve dvou časových intervalech po infekci (p.i.) a to po 24h a 48h. Buňky L929 byly s interferony inkubovány 4,5h před infekcí.

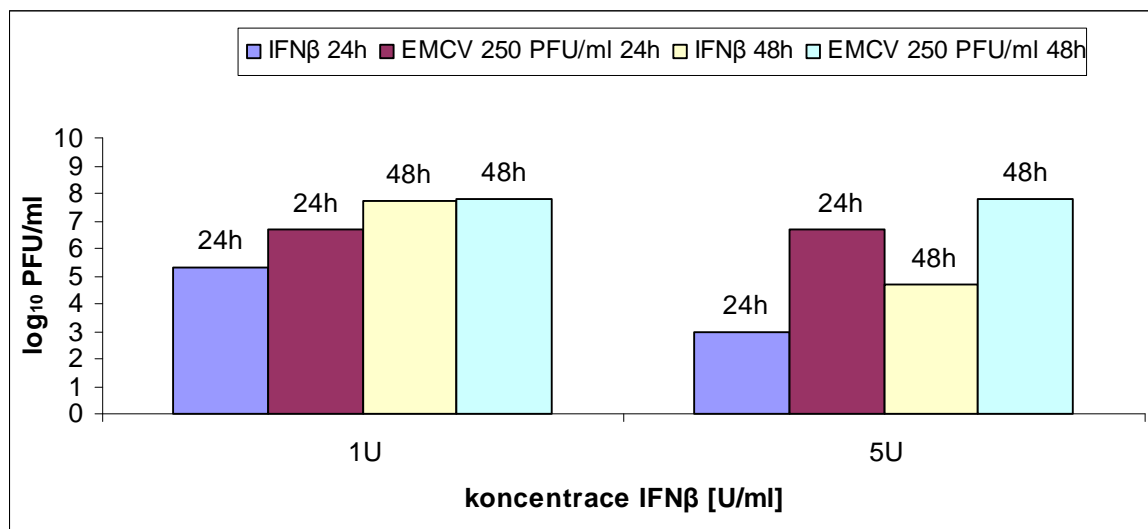
V případě IFN  $\beta$  se testovaly dvě koncentrace a to 1U/ml a 5U/ml proti infekčním dávkám EMCV 25 PFU/ml a 250 PFU/ml. Zřetelný antivirový účinek byl detekovatelný již za 24h p.i. při použití 1U/ml, kdy replikace viru dosáhla  $2 \times 10^5$  PFU/ml a účinkem IFN $\beta$  byla snížena pod detekovatelné množství na méně než 50 PFU/ml. Za 48h replikace viru dosáhla  $2,5 \times 10^7$  PFU/ml a působením IFN  $\beta$  byla snížena na  $4 \times 10^5$  PFU/ml. Při použití IFN  $\beta$  5U/ml byla replikace viru za 24h i 48h snížena pod detekovatelné množství na méně než 50 PFU/ml (Obr. 4.1.).



**Obr. 4.1.** Antivirový účinek IFN $\beta$  o koncentraci 1U/ml a 5U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 25PFU/ml.

Při použití EMCV 250 PFU/ml dosáhla replikace viru za 24h  $5 \times 10^6$  PFU/ml a účinkem 1U IFN $\beta$  byla snížena na  $2 \times 10^5$  PFU/ml. Za 48h byl účinek 1U IFN  $\beta$  výrazně slabší. Replikace viru za 48h dosáhla  $6 \times 10^7$  PFU/ml a účinkem 1U IFN  $\beta$  snížena na  $5 \times 10^7$  PFU/ml.

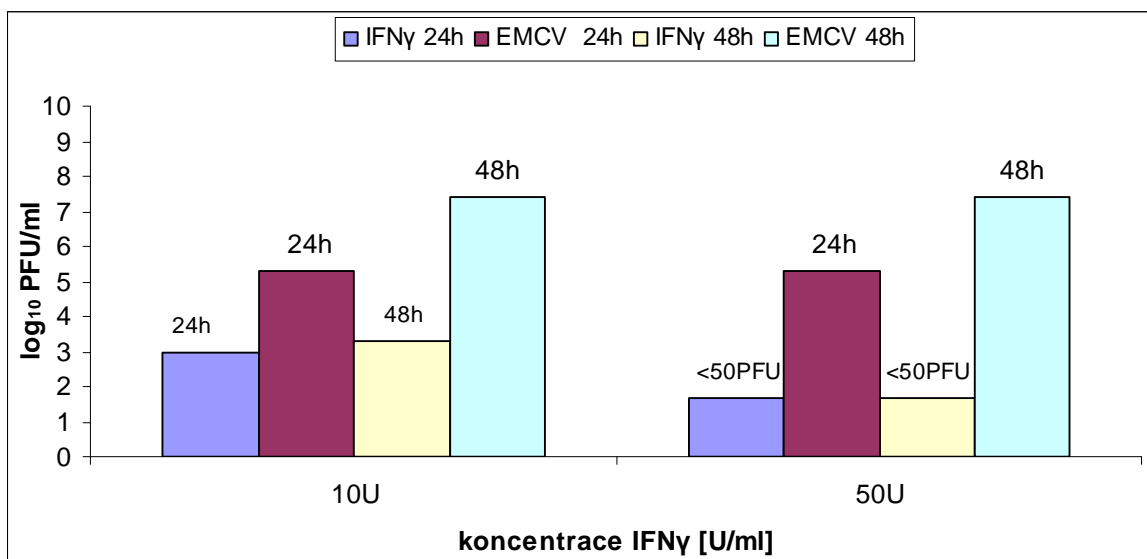
Při použití 5U IFN  $\beta$  byla replikace viru snížena za 24h na  $1 \times 10^3$  PFU/ml a za 48h na  $5 \times 10^4$  PFU/ml (Obr. 4.2.).



**Obr. 4.2.** Antivirový účinek IFN $\beta$  o koncentraci 1U/ml a 5U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 250 PFU/ml.

V případě IFN  $\gamma$  se testovaly také dvě koncentrace a to 10U/ml a 50U/ml proti infekčním dávkám EMCV 25 PFU/ml a 250 PFU/ml. Zřetelný antivirový účinek byl detekovatelný již za 24h p.i. při použití 10U IFN  $\gamma$ , kdy replikace viru dosáhla  $2 \times 10^5$  PFU/ml a účinkem IFN  $\gamma$  byla snížena na  $1 \times 10^3$  PFU/ml. Za 48h replikace viru dosáhla  $2,5 \times 10^7$  PFU/ml a působením IFN  $\gamma$  byla snížena na  $2 \times 10^3$  PFU/ml.

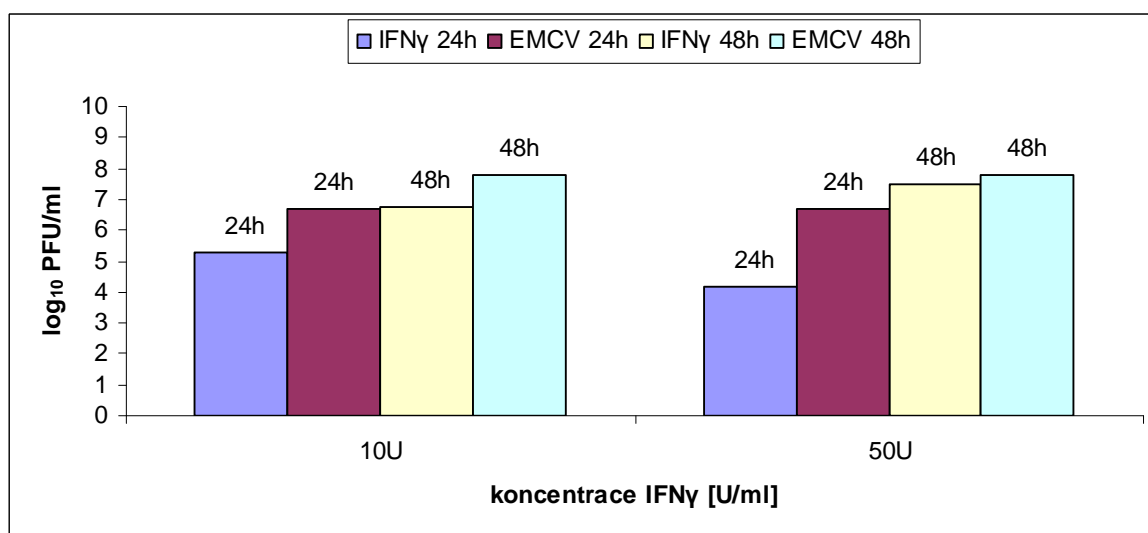
Při použití 50U IFN  $\gamma$  byla replikace viru za 24h i 48h snížena pod detekovatelné množství viru na méně než 50 PFU/ml (Obr. 4.3.).



**Obr. 4.3.** Antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml a 50U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

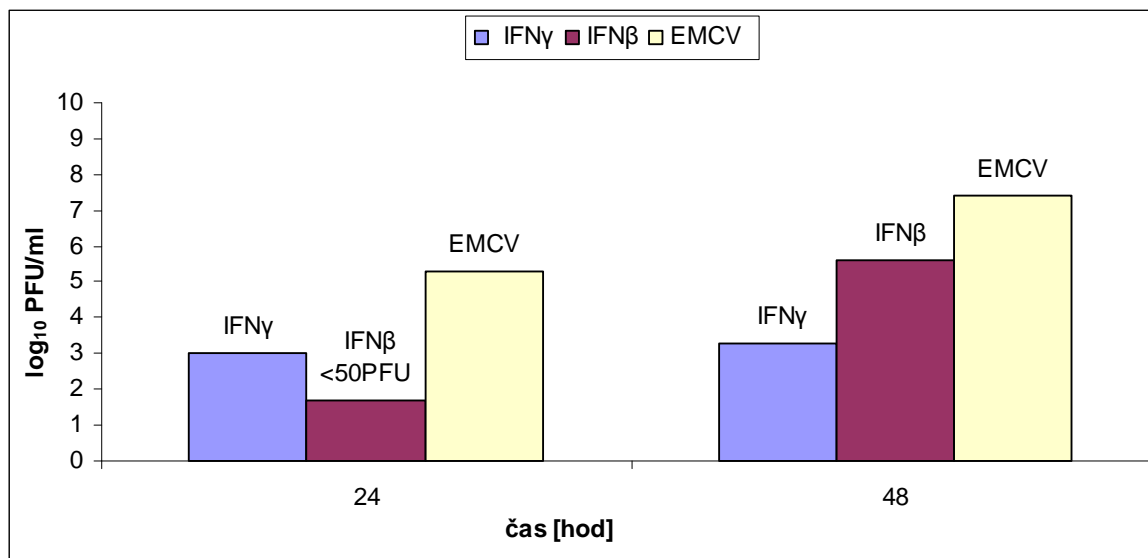
Při použití EMCV 250 PFU/ml dosáhla replikace viru za 24h  $5 \times 10^6$  PFU/ml a byla snížena účinkem 10U IFN $\gamma$  na  $2 \times 10^5$  PFU/ml. Replikace viru za 48h dosáhla  $6 \times 10^7$  PFU/ml a účinkem 10U IFN  $\gamma$  snížena na  $6 \times 10^6$  PFU/ml.

Při použití 50U IFN  $\gamma$  byla replikace viru snížena za 24h na  $1,5 \times 10^4$  PFU/ml a za 48h na  $3 \times 10^7$  PFU/ml (Obr. 4.4.).



**Obr. 4.4.** Antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml a 50U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 250 PFU/ml.

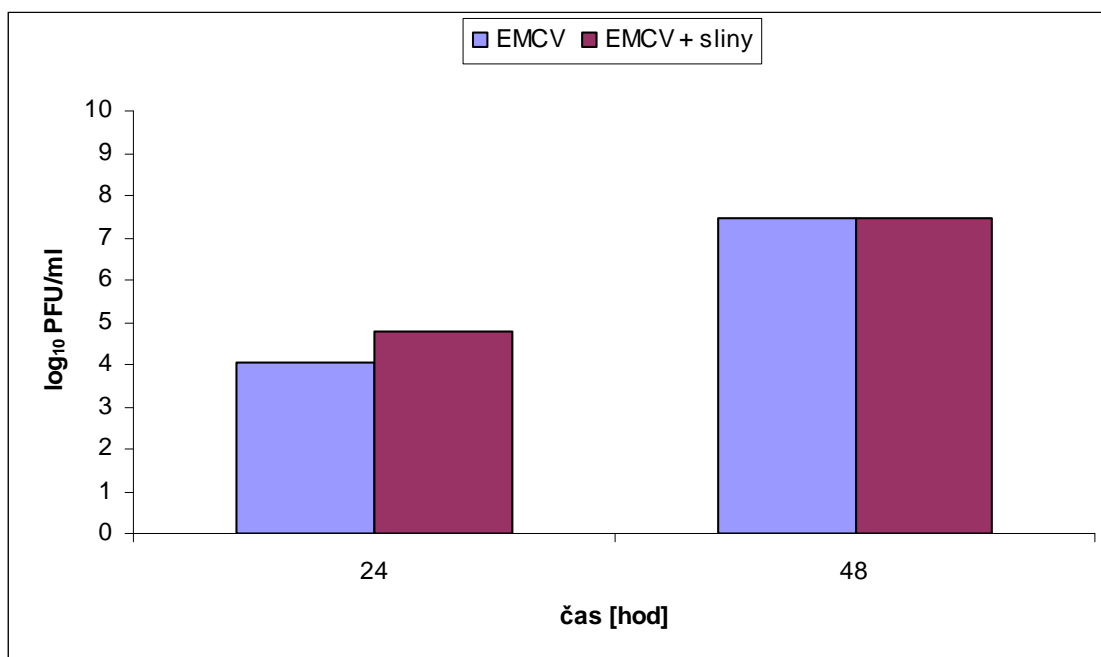
Na základě porovnání antivirových účinků interferonů jsme zvolili pro další pokusy infekční dávku viru EMCV 25 PFU/ml a koncentraci 10U/ml IFN  $\gamma$  a 1U/ml IFN  $\beta$ . Oba interferony, jak IFN  $\gamma$  tak IFN  $\beta$  byly schopny potlačit replikaci viru EMCV (Obr. 4.5).



**Obr. 4.5.** Srovnání antivirového účinku 10U/ml IFN  $\gamma$  a 1U/ml IFN  $\beta$  za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

## 4. 2. Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci EMCV

Stimulační účinek slin na replikaci viru vesikulární stomatidy (VSV) byl prokázán (Hajnická a kol, 1998). S cílem zjistit zda sliny získané z klíštěte *Ixodes ricinus* budou mít podobný stimulační účinek na replikaci viru EMC, byly buňky L929 inkubovány se slinami 4,5h před infekcí. Použitá koncentrace slin byla 10  $\mu$ g/ml. Účinek slin na replikaci viru byl pozorován za 24h a 48h p.i. Experiment ukázal, že sliny zvyšují replikaci viru EMC v intervalu 24h z  $1,2 \times 10^4$  PFU/ml na  $5,8 \times 10^4$  PFU/ml. Vliv slin na replikaci viru EMC nebyl za 48h prokázán (Obr. 4.6.).



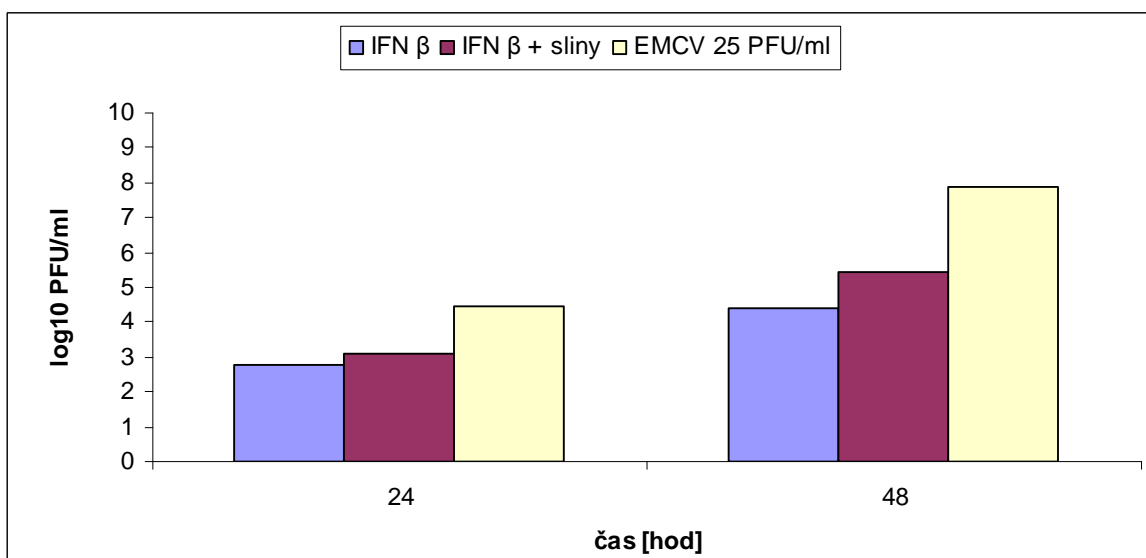
**Obr. 4.6.** Vliv klíštěcích slin na replikaci EMCV. Sliny o koncentraci 10 µg proteinů/ml byly inkubovány s buňkami L929 4,5h před infekcí. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

### 4. 3. Vliv klíštěcích slin na antivirový účinek IFN γ a IFN β

Jedním ze způsobů, jak vysvětlit stimulační účinek slin na replikaci viru je, že jejich působením je inhibován účinek interferonu, který je produkován buňkami napadenými virem. V tomto experimentu jsme testovali antivirový účinek IFN β a IFN γ v přítomnosti slin klíštěte *Ixodes ricinus*.

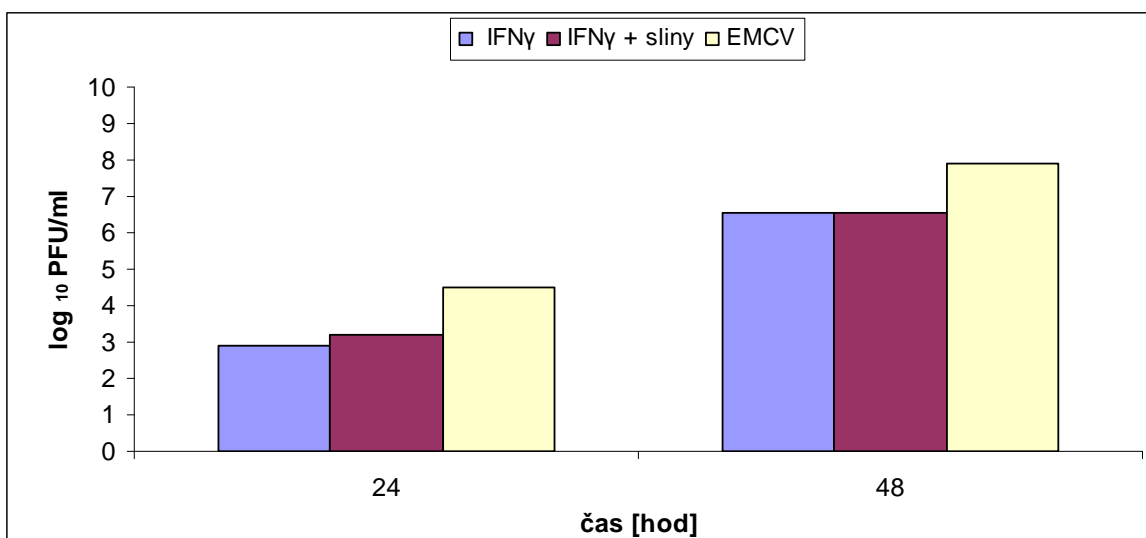
Nejdříve byly buňky L929 inkubovány 4,5h před infekcí se slinami o koncentraci 10 µg/ml, k nim byl přidán IFN β o koncentraci 1U/ml 2,5h před infekcí. Poté následovala infekce virem EMC 25 PFU/ml.

Antivirový účinek IFN β byl částečně potlačen tak, že replikace viru byla zvýšena za 48h z  $2 \times 10^4$  PFU/ml na  $2,8 \times 10^5$  PFU/ml. Za 24h se replikace viru zvýšila z  $6,2 \times 10^2$  PFU/ml na  $1,2 \times 10^3$  PFU/ml (Obr. 4.7.)



**Obr. 4.7.** Vliv slin na antivirový účinek IFN  $\beta$  1U/ml za 24h a 48h p.i. Sliny o koncentraci 10  $\mu$ g proteinů/ml byly s buňkami L929 inkubovány 4,5h před infekcí a IFN  $\beta$  2,5h před infekcí. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

Na antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml se vliv klíštěcích slin příliš neprojevil za 24h ani za 48h p.i., narozdíl od IFN  $\beta$ . Za 24h p.i. se replikace nepatrně zvýšila z  $8,3 \times 10^2$  PFU/ml na  $1,5 \times 10^3$  PFU/ml (Obr. 4.8.).

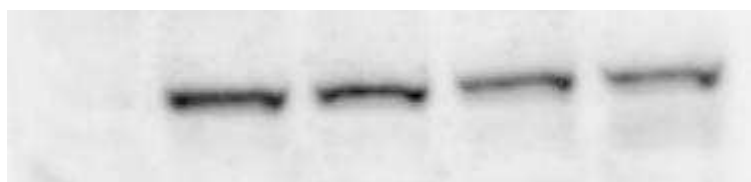


**Obr. 4.8.** Vliv slin na antivirový účinek IFN  $\gamma$  10U/ml za 24h a 48h p.i. Sliny o koncentraci 10  $\mu$ g proteinů/ml byly s buňkami L929 inkubovány 4,5h před infekcí a IFN  $\gamma$  2,5h před infekcí. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

#### 4. 4. Vliv klíčtějších slin na aktivaci signálních drah důležitých pro antivirový účinek IFN

IFN po navázání na specifický receptor spouští aktivaci Jak/Stat signální dráhy. Výsledkem je zahájení transkripce interferonem stimulovaných genů, jejichž produkty jsou zodpovědné za navození antivirového stavu buňky. Aktivace Jak/Stat signální dráhy byla měřena fosforylací transkripčního faktoru Stat1 s využitím metody Western blot. Buňky L929 byly inkubovány 3h se slinami o koncentraci 20μg/ml a k odpovídajícím kontrolám byl přidán 4mM roztok pilokarpinu ve stejném objemu jako sliny. Buňky byly poté stimulovány 30 minut s IFN β nebo IFN γ o koncentraci 5U/ml. Oba interferony indukovaly v L929 buňkách fosforylaci Stat1 proteinu. Přítomnost slin negativně ovlivnila interferonem stimulovanou Stat1 aktivaci. V případě IFN β byla aktivace snížena o 21% v porovnání s kontrolou (buňky stimulované IFN β). U IFN γ došlo ke snížení o 47% v porovnání s kontrolou (buňky stimulované IFN γ) (Obr.4.9.).

IFNγ (5U/ml)	-	+	-	-	+
IFNβ (5U/ml)	-	-	+	+	-
Sliny (20μg/ml)	-	-	-	+	+
Pilokarpin	-	+	+	-	-



**Obr. 4.9.** Vliv slin na fosforylaci Stat1 v L929 buňkách po stimulaci s IFN γ a IFN β.

Další signální dráhou, která přispívá k antivirovému účinku interferonů a je jimi aktivovaná, je dráha zprostředkovaná fosfatidylinositol-3 kinázou. Mezi její efektorové kinázy patří serin-threoninová kináza Akt. Zajímalo nás, zda-li sliny mají vliv na aktivaci PI3K/Akt dráhy. Buňky L929 byly inkubovány 3h se slinami o koncentraci 20μg/ml a k odpovídajícím kontrolám byl přidán 4mM roztok pilokarpinu ve stejném objemu jako sliny. Buňky byly poté stimulovány 30 minut IFN β nebo IFN γ o koncentraci 5U/ml. IFN β nezpůsobil zvýšení aktivity Akt kinázy na rozdíl od IFN γ, který simuloval aktivitu Akt o 22% vůči kontrole (vzorek bez stimulace). Aktivace Akt byla výrazně ovlivněna v přítomnosti slin. Po stimulaci s IFN γ došlo k snížení o 67% a u IFN β byl pozorován pokles o 66% vůči kontrole (buňky stimulované IFN β) (Obr. 4.10.).

IFN $\gamma$ (5U/ml)	-	+	-	-	+
IFN $\beta$ (5U/ml)	-	-	+	+	-
Sliny (20 $\mu$ g/ml)	-	-	+	-	+
Pilokarpin	-	+	-	+	-



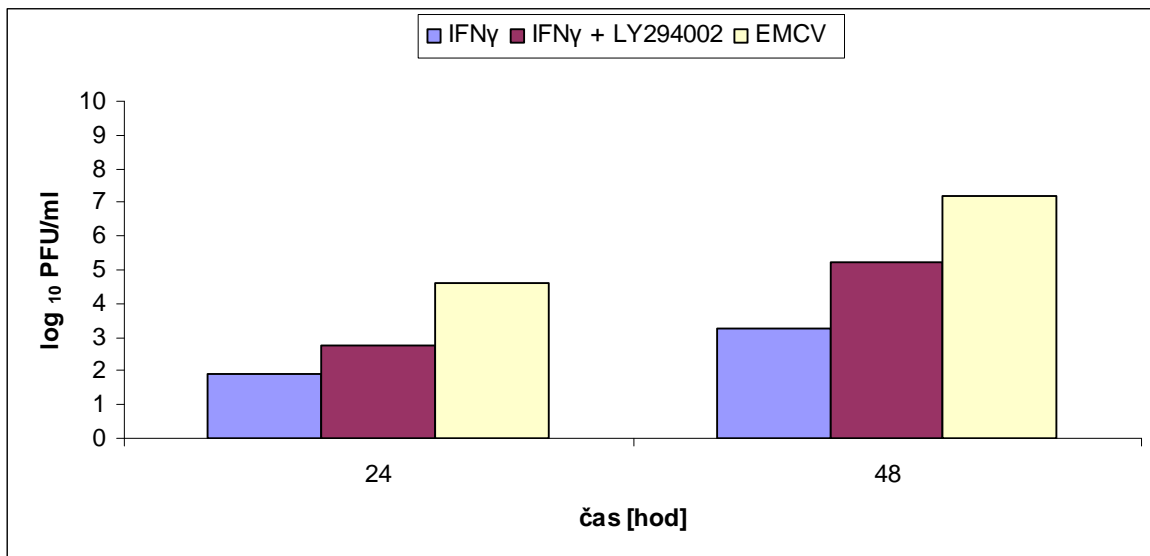
**Obr. 4.10.** Vliv slin na fosforylaci Akt v L929 buňkách po stimulaci s IFN  $\gamma$  a IFN  $\beta$ .

#### 4. 5. Vliv farmakologického inhibitoru fosfatidylinositol-3 kinázy na antivirový účinek IFN $\beta$ a IFN $\gamma$

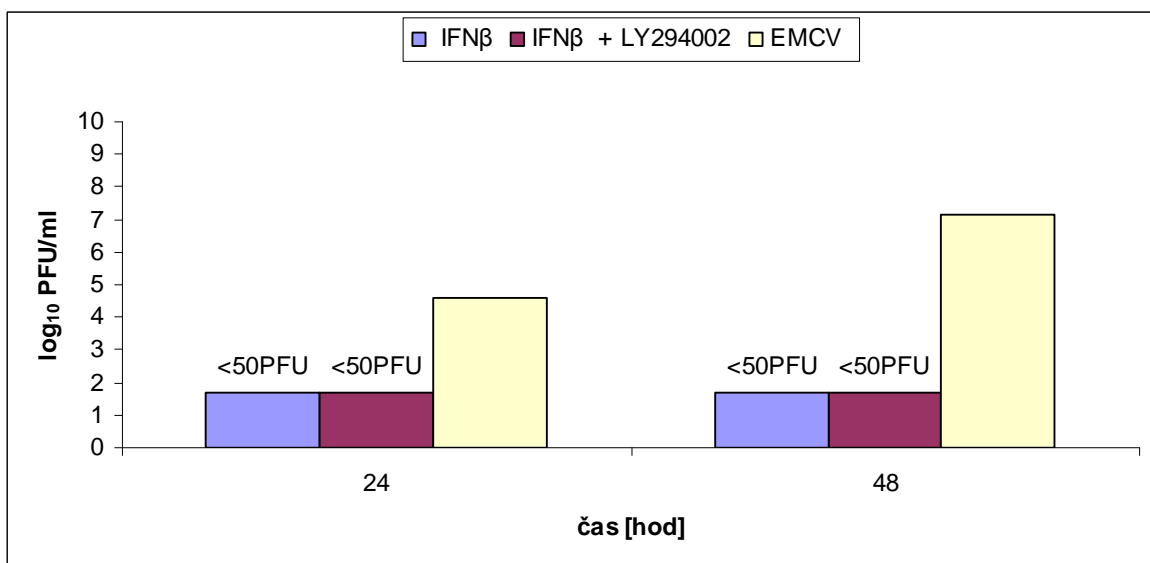
Antivirový účinek interferonů je závislý na funkčnosti PI3K dráhy (Uddin a kol, 2000). Naše experimenty ukázaly, že aktivace Akt, efektoru PI3K, byla vlivem slin snížena. S cílem vysvětlit rozdíl v účinku slin na antivirový efekt IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$  jsme testovali, zda jsou oba interferony stejně citlivé k inhibici PI3K. Inhibitor PI3K (LY294002, Sigma-Aldrich) byl přidán o 1 $\mu$ M koncentraci k buňkám L929 na 30 minut. Buňky byly následně stimulovány IFN  $\beta$  o koncentraci 1U/ml a IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml 2,5h před infekcí. K infekci bylo použito 25 PFU/ml viru EMC. Replikace viru v buňkách inkubovaných s IFN  $\gamma$  byla zvýšena působením inhibitoru PI3K za 24h z 8,3x10<sup>1</sup> PFU/ml na 6x10<sup>2</sup> PFU/ml. Po 48h byla replikace viru výrazně zvýšena z 1,7x10<sup>3</sup> PFU/ml na 1,6x10<sup>5</sup> PFU/ml (Obr. 4.11.).

Narozdíl od IFN  $\gamma$  se inhibice PI3K neprojevila na antivirovém účinku IFN  $\beta$  za 24h ani za 48h p.i.(Obr. 4. 12.) Replikace viru byla snížena pod detekovatelné množství viru menší než 50 PFU/ml po 24h i 48h po infekci. Experiment tedy ukázal, že inhibice PI3K/Akt dráhy snižuje antivirový účinek IFN  $\gamma$ , ale ne IFN  $\beta$ .





**Obr. 4.11.** Vliv inhibitoru PI3K (LY294002) o 1 $\mu$ M koncentraci na antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.



**Obr. 4.12.** Vliv inhibitoru PI3K (LY294002) o 1 $\mu$ M koncentraci na antivirový účinek IFN  $\beta$  o koncentraci 1U/ml za 24h a 48h p.i. Infekční dávka EMCV 25 PFU/ml.

## 5. Diskuze

Slinami aktivovaný přenos (SAT efekt) je jev, kdy klíštěcí sliny usnadňují přenos patogenu do hostitele. Poprvé byl tento jev popsán u přenosu Togoto viru (Nuttall a Jones, 1991). Předmětem této práce bylo charakterizovat vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci viru EMC, na antivirové účinky interferonů a buněčné signální dráhy stimulované IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$ .

Výsledek našich pokusů ukázal, že sliny *Ixodes ricinus* mají na replikaci viru encefalomyokarditidy pozitivní vliv. Účinek slin se na replikaci viru projevil výrazněji po 24h než po 48h po infekci. Podobný výsledek byl popsán v práci Hajnické a kol (1998), ve které vliv slin na replikaci viru měl ovšem výrazněji účinek. Důvodem může být skutečnost, že Hajnická a kol, používali homogenizovaný extrakt ze slinných žláz (SGE) narozdíl od našich pokusů, v kterých jsme používali klíštěcí sliny. Další odlišností bylo použití jiných druhů klíšťat *Rhipicephalus appendiculatus* a *Dermacentor reticulatus*. Mechanismus, kterým sliny klíšťat usnadňují replikaci viru, není znám. Zdá se, že účinek slin závisí na tom, z kterého druhu klíštěte jsou sliny odebrány. Klíštěcí sliny produkují farmakologicky aktivní proteiny, které se liší mezi různými druhy klíšťat, ale i mezi jednotlivci stejného druhu. Neméně důležitá je i doba sání klíšťat na hostiteli, což může ovlivnit složení slin nebo SGE používaných v pokusu (Lawrie a Nuttall, 2001; Kocáková a kol, 2003).

Stimulační účinek slin na replikaci viru byl vysvětlen inhibicí antivirového účinku IFN $\alpha/\beta$  (Hajnická a kol, 2000). My jsme porovnávali vliv slin na antivirový účinek obou typů interferonů, IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$ . IFN  $\beta$  patří do interferonů typu I. Hraje důležitou roli v první fázi hostitelovi obrany a je schopen potlačit virovou infekci. Je produkován infikovanými buňkami, ale působí i na okolní buňky (Pestka a kol, 2004). IFN  $\gamma$  se řadí k interferonům typu II a je syntetizován pouze určitými buňkami imunitního systému, zahrnujícím NK buňky, CD4 Th1 buňky, CD8 cytotoxické supresorové buňky (Boem a kol, 1997). Oba interferony mají výrazné antivirové účinky. Při testování vlivu slin na antivirové účinky interferonů jsme zjistili, že sliny částečně inhibují ochrannou schopnost IFN  $\beta$ . Tento efekt se výrazněji projevil za 48h než za 24h po infekci. Naopak na antivirový účinek IFN  $\gamma$  nemělo působení slin žádný vliv.

Rozdílný výsledek v působení slin na antivirový účinek interferonů by mohl být vysvětlen tím, že složky signálního aparátu ovlivněné slinami mohou být součástí jen signální dráhy pro IFN  $\beta$ .

S cílem porozumět účinku slin na interferony, jsme se zaměřili na aktivaci buněčných signálních drah stimulovaných IFN typu I a typu II. Nejlépe popsanou signální dráhou je Jak/Stat signální dráha, jejíž aktivace v rozhodující míře přispívá k antivirovému účinku interferonů. Fosforylovaný Stat1 vytváří dimer a je součástí transkripčního faktoru stimulujícího geny ze dvou promotorů, GAS a ISRE (Platanias, 2005).

Naše experimenty ukázaly, že fosforylace Stat1 je částečně inhibována slinami po stimulaci s IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$ . Stat1 protein je fosforylován na jeho tyrosinovém zbytku Jak kinázou, která se aktivuje po navázání IFN na jeho receptor, čímž se změní konformační uspořádání Jak kináz a umožní to jejich transfosforylaci (Platanias, 2005). Existuje několik možností, jak vysvětlit slinami sníženou aktivaci Stat1. Jedním z mechanismů by mohl být přímý účinek slin na aktivaci Jak kinázy. Dalším způsobem, kterým sliny mohou ovlivňovat Stat1 fosforylaci je přes negativní regulátory Jak/Stat signální dráhy. Příkladem může být například cytoplazmatická fosfatáza SHP-2, která defosforyluje aktivované Jak kinázy a tím snižuje fosforylaci Stat1 (Klingmuller a kol, 1995). Snížená aktivita Stat1 by také mohla být vyvolána SOCS proteiny, které se vážou na Jak kinázy, čímž znemožňují vazbu Stat proteinu a následně dochází k inhibici jejich fosforylace (Kile a kol, 2002).

Další signální dráhou, jejíž aktivace byla testována po stimulaci interferonem v přítomnosti klíštěcích slin byla fosfatidylinositol-3 kináza (PI3K), respektive její efektorová kináza Akt. Aktivace Akt je důležitá pro mRNA translaci interferonem stimulovaných genů a tedy důležitá pro biologické účinky IFN (Kaur, 2008). Naše experimenty ukázaly, že sliny působí inhibičně na aktivitu Akt po stimulaci s IFN  $\beta$  i IFN $\gamma$ . Vysvětlení tohoto snížení může být na podobném principu jako u snížení Stat1. Mohlo dojít k defektu fosforylace Jak kináz, které jsou důležité, jak pro fosforylaci Stat1, tak i pro aktivaci insulinového receptorového substrátu (IRS), který je nepostradatelný pro aktivaci PI3K (Burfoot a kol, 1997).

Existuje několik důkazů o nezbytnosti funkční PI3K dráhy pro navození antivirového stavu interferonem (Uddin a kol, 2000, Nguyen a kol, 2001). Naše experimenty ukázaly, že aktivace Akt, efektoru PI3K, byla vlivem slin snížena. Sliny inhibovali jen antivirový účinek IFN  $\beta$ . S cílem vysvětlit rozdíl v účinku slin na antivirový efekt IFN  $\beta$  a IFN  $\gamma$  jsme testovali, zda jsou oba interferony stejně citlivé k inhibici PI3K. Překvapivě, inhibitor PI3K neovlivnil antivirový účinek IFN  $\beta$ . Antivirový účinek IFN $\gamma$  byl vlivem inhibice PI3K snížen. Přesto, že sliny inhibují PI3K/Akt aktivaci v L929 buňkách, inhibice PI3K se na antivirový účinek IFN  $\beta$  neprojevila. Proto usuzujeme, že tato dráha nebyla důležitá k antivirovému projevu IFN  $\beta$  v našich experimentálních podmínkách.

## 6. Souhrn

- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* již o koncentraci 10 $\mu$ g proteinů/ml mírně zvyšují replikaci viru myší encefalomyokarditidy v L929 buňkách za 24h p.i. Za 48h p.i. se vliv slin o koncentraci 10 $\mu$ g proteinů/ml neprokázal.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* o koncentraci 10 $\mu$ g proteinů/ml částečně snižují antivirový účinek IFN  $\beta$  o koncentraci 1U/ml v časovém intervalu 48h p.i.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* o koncentraci 10 $\mu$ g proteinů/ml nemají prokazatelný vliv na antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml v časových intervalech 24h a 48h p.i.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml snižují o 21% fosforylaci Stat1 proteinu v L929 buňkách, které byly stimulovány IFN  $\beta$  o koncentraci 5U/ml.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml snižují o 47% fosforylaci Stat1 proteinu v L929 buňkách, které byly stimulovány IFN  $\gamma$  o koncentraci 5U/ml.
- Aktivita Akt kinázy je snížena vlivem slin klíštěte *Ixodes ricinus* o koncentraci 20 $\mu$ g proteinů/ml v L929 buňkách stimulovaných IFN  $\beta$  i IFN  $\gamma$ .
- Antivirový účinek IFN  $\gamma$  o koncentraci 10U/ml je výrazně snížen působením inhibitoru PI3K (LY294002) o 1 $\mu$ M koncentraci v časových intervalech 24h a 48h p.i.
- Inhibitor PI3K (LY294002) o 1 $\mu$ M koncentraci nemá prokazatelný vliv na antivirový účinek IFN  $\beta$  o koncentraci 1U/ml v časových intervalech 24h a 48h p.i. v našich experimentálních podmínkách.

## 7. Seznam literatury

**Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D., 1997.** The IFN  $\gamma$  receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology* 15: 563-591.

**Biron C.A., 1998.** Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- $\alpha/\beta$ ), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Immunology* 10: 383–390.

**Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C., 1997.** Cellular responses to interferon  $\gamma$ . *Annual Review of Immunology* 15: 749-795.

**Bradford M.M., 1976.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.

**Brossard M., Wikel S.K., 2004.** Tick immunobiology. *Parasitology* 129: 161–176.

**Burfoot M.S., Rogers N.C., Watling D., Smith J.M., Pons S., Paonessaw G., Pellegrini S., White M.F., Kerr I.M., 1997.** Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 24183–24190.

**Cavassani K.A., Aliberti J.C., Dias A.R.V., Silva J.S., Ferreira B.R., 2005.** Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 114: 235–245.

**Chan S.H., Perussia B., Gupta J.V., Kobayashi M., Pospíšil M., Young H.A., Wolf S.F., Young D., Clark S.C., Trinchieri G., 1991.** Induction of interferon  $\gamma$  production by Natural Killer Cells stimulatory factor: Characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 869-879.

**Colamonici O.R., Pfeffer L.M., D'Alessandro F., Platanias L.C., Gregory S.A., Rosolen A., Nordan R., Cruciani R.A., Diaz M.O., 1992.** Multichain structure of the IFN-alpha receptor on hematopoietic cells. *The Journal of Immunology* 148: 2126-2132.

**Cupp E.W., 1991.** Biology of ticks. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 21: 1–26.

**Darnell Jr. J.A., Kerr I.M., Stark G.R., 1994.** Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to INFs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415–1421.

**Darnell Jr. J.A., 1997.** STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630 – 1635.

**Domanski P., Witte M., Kellum M., Rubinstein M., Hackett R., Pitha P., Colamonici O.R., 1995.** Cloning and expression of a long form of the  $\beta$  subunit of the interferon  $\alpha\beta$  receptor that is required for signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 21606–21611.

**Earle W.R., 1943.** Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *Journal of National Cancer Institute* 4: 165.

**Gajdusek D.C., 1955.** Encephalomyocarditis virus infection in childhood. *Pediatrics* 16: 902–906.

**Gillespie R.D., Mbow M.L., Titus R.G., 2000.** The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 22: 319–331.

**Grobler D.G., Raath J.P., Braack L.E.O., Keet D.F., Gerdes G.H., Barnard B.J.H., Krick N.P.J., Jardine J., Swanepoet R., 1995.**  
An outbreak of Encephalomyocarditisvirus infection in free ranging African elephants in the Kruger National Park. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 62: 97–108.

**Hajnicka V., Fuchsberger N., Slovak M., Kocáková P., Labuda M., Nuttall P.A., 1998.** Tick salivary glands extracts promote virus growth in vitro. *Parasitology* 116: 533–538.

**Hajnická V., Kocáková P., Slovák M., Labuda M., Fuchsberger N., Nuttall P.A., 2000.** Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunology* 22: 201–206.

**Hajnická V., Kocáková P., Sláviková M., Slovák M., Gašperík J., Fuchsberger N., Nuttall P.A., 2001.** Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology* 23: 483–489.

- Hajnická V., Vančová I., Kocáková P., Slovák M., Gašperík J., Sláviková M., Hails R.S., Labuda M., Nuttall P.A., 2005.** Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130: 333–342.
- Hopps H.E., Bernheim B.C., Nisalak A., Tjio J.H., Smadel J.E., 1963.** Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the African green monkey. *The Journal of Immunology* 91: 416–424.
- Horvath C.M., Darnell Jr. J.E., 1996.** The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *Journal of Virology* 70: 647–650.
- Jones L.D., Kaufman W.R., Nuttall P., 1992.** Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experientia* 48: 779–782.
- Jones P., Mahamba C., Rest J., André C., 2004.** Fatal inflammatory heart disease in a bonobo (*Pan paniscus*). *Journal of Medical Primatology* 34: 45–49.
- Kaur S., Sassano A., Dolniak B., Joshi S., Majchrzak-Kita B., Baker D.P., Hay N., Fish E.N., Plataniias L.C., 2008.** Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 4808–4813.
- Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martina H.M.F., Hilton D.J., 2002.** The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 235–241.
- Klingmüller U., Lorenz U., Cantley L.C., Neel B.G., Lodish H.F., 1995.** Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80: 729–738.
- Kocáková P., Sláviková M., Hajnická V., Slovák M., Gašperík J., Vančová I., Fuchsberger N., Nuttall P., 2003.** Effect of fast protein liquid chromatography fractionated salivary gland extract from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. *Folia Parasitology* 50: 79–84.

- 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: 351–356.
- Kopecký J., Kuthejlová M., 1998.** Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunology* 20: 169–174.
- Kramer M.J., Dennin R., Kramer C., Jones G., Connell E., Rolon N., Gruarin A., Kale R., Trown P.W., 1983.** Cell and virus sensitivity studies with recombinant human alpha interferons. *Journal of Interferon Research* 3: 425–435.
- Laemmli U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lawrie C.H., Randolph S.H., Nuttall P.A. 1999.** *Ixodes* Ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology* 93: 207–214.
- Lawrie C.H., Nuttall P.A., 2001.** Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. *Parasite Immunology* 23: 549–556.
- Lutfalla G., Holland S.J., Cinato E., Monneron D., Reboul J., Rogers N.C., Smith J.M., Stark G.P., Gardiner K., Mogensen K.E., 1995.** Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *The EMBO Journal* 14: 5100–5108.
- de Madrid and Porterfield, 1969.** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40: 113–121.
- Muller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi F., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M., 1994.** Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918–1921.
- Nguyen H., Ramana C.V., Bayes J., Stark G.R., 2001.** Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in Interferon-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 33361–33368.



- Novick D., Cohen B., Rubinstein M., 1994.** The human interferon  $\alpha/\beta$  receptor: Characterization and molecular cloning. *Cell* 77: 391–400.
- Nuttall P.A., 1998.** Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology* 116: 65–72.
- Nuttall P.A., Jones L.D., 1991.** Non-viraemic tickborne virus transmission: mechanism and significance. In *Modern Acarology* (ed. Dusbabek, F. & Bukva, V.), pp. 3–6. Prague and The Hague, Academia and SPB Academic Publishing bv.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2004.** Tick-host interactions: saliva activated transmission. *Parasitology* 129: 177–189.
- Oberste M.S., Gotuzzo E., Blair P., Nix W.A., Ksiazek T.G., Comer J.A., Rollin P., Goldsmith C.S., Olson J., Kochel T.J., 2009.** Human febrile illness caused by Encephalomyocarditis virus infection. *Peru Emerging Infectious Diseases* 15: 640–646.
- Palosaari H., Parisien J.P., Rodriguez J.J., Ulane C.M., Horvath C.M., 2003.** Stat protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *Journal of Virology* 77: 7635–7644
- Parmar S., Platanius L., 2003.** Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Current Opinion Oncology* 15: 431–439.
- Pestka S., Krause C.D., Walter M.R., 2004.** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202: 8–32.
- Platanius L.C., 2005.** Mechanisms of type I and type II interferon mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* 5: 375–386.
- Reddacliff L., Kirkland P.D., Hartley W.J., Reece R.L., 1997.** Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 28: 153–157.
- Sadler A.J., Williams B.R.G., 20008.** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*: 859–568.
- Sanford K.K., Earle W.R., Likely G.D., 1948.** The growth in vitro of single isolated tissue cells. *Journal of the National Cancer Institute* 9: 229–246.

- Seaman J.T., Finnie E.P., 1987.** Acute myocarditis in a captive African elephant (*Loxodonta africana*). *Journal of Wildlife Diseases* 23: 170–171.
- Spadbrow P.B., Chung Y.S., 1970.** Hemagglutination-inhibition antibodies to encephalomyocarditis virus in Queensland cattle. *Australian Veterinary Journal* 46: 126–128.
- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D., 1998.** How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* 67: 227–264.
- Torpey N., Maher S.E., Bothwell A.L.M., Pober J.S., 2004.** Interferon but not interleukin 12 activates STAT4 signaling in human vascular endothelial cells. *The Journal Biological Chemistry* 279: 26789–26796.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon T., 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350–4354.
- Trinchieri G., 1995.** Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 13: 251–276.
- Uddin S., Woodson J., Arunkumar P., Alsayed Y., Pine R., Young P.R., Fish E.N., Platanias L.C., 1999.** Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 30127–30131.
- Uddin S., Majchrzak B., Wang P., Modi S., Khan M.K., Fish E.N., Platanias L.C., 2000.** Interferon-dependent activation of the serine kinase PI3'-kinase requires engagement of the IRS pathway but not the Stat pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 158–162.
- Valenzuela J.G., Charlab R., Mather T.N., Ribeiro J.M.C., 2000.** Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717–18723.

**Vančová I., Hajnická V., Slovák M., Nuttall P.A., 2009.** Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding. *Veterinary Parasitology* 167: 274–278.

**Wells S.K., Gutter A.E., Soike K.F., Baskin G.B., 1989.** Encephalomyocarditis virus: Epizootic in a zoological collection. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 20: 291–296.

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

**Wikel S.K., 1999.** Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology* 29: 851–859.