

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

Vliv klíčtécích slin na interakce mezi spirochetami *Borrelia afzelii* a myšími dendritickými buňkami

Bc. Martina Slámová

Školitel: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.
Školitel specialista: RNDr. Anna Fialová PhD

České Budějovice
2010

Slámová M., 2010: Vliv klíštěcích slin na interakce mezi spirochetami *Borrelia afzelii* a myšími dendritickými buňkami. [The effect of tick saliva on the interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. Mgr. Thesis, in Czech] 37p – Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation

Interaction between mouse dendritic cells (DCs) and *Borrelia afzelii* spirochetes was studied on three different levels: phagocytosis of borrelia by DCs, production of cytokines by borrelia-activated DCs and the ability of DCs to activate CD4+ T cells. The effect of *Ixodes ricinus* saliva on each of these levels was examined. Tick saliva was shown to decrease the number of phagocytosing DCs. The ability of borrelia-activated DCs to induce both proliferation and IL-2 production in specific CD4+ T cells was significantly reduced by tick saliva. And surprisingly, we have shown an inhibitory effect of *I. ricinus* saliva on the production of both Th1 (IL-6 and TNF- α) and Th2 (IL-10) cytokines. Our data reveal a complex inhibitory effect of tick saliva on DC function.

Práce byla financována z grantu GAAV ČR IAA600960811.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem předkádanou magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 27. dubna 2010

.....

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat mému školiteli, docentu Janu Kopeckému, za to, že mi umožnil pracovat v jeho laboratoři. Aničce Skallové-Fialové, která mě všechno od začátku naučila, měla se mnou trpělivost, vždycky mi poradila a ve chvílích nejhorších doporučovala bylinkové čaje ☺. Dále moje díky patří celému kolektivu naší laboratoře, dokotru Jiřímu Salátovi, Verče, Helče, Páje a Jarce za to, že mi pomohli se vším, co jsem kdy potřebovala. Také Helče Pěničkové a profesoru Františku Marecovi za pomoc s fluorescenčním mikroskopem.

Děkuji akademické knihovně za krásné prostředí, kde jsem se mohla soustředit na psaní a Singru, kde jsem mohla na psaní občas zapomenout.

Děkuji J.S. Bachovi za úžasnou hudbu, kterou složil a která mi pomohla se nezbláznit. Green Day a Pětě za to, že mi dali motivaci a cíl. Mirce děkuji, že byla nejlepší spolubydlící na světě. Bíbě za to, že mě vždycky vytrahla na procházku a přivedla na jiné myšlenky. Paní doktorce Evě, za všechno, co pro mě kdy udělala. A všem mým kamarádům, co si se mnou prošli dobrým i zlým, a díky kterým toho zlého bylo minimum.

Děkuji oddělení jazyků, že mě naučili anglicky, abych rozuměla, co se píše v článcích a věděla jak vyslovit analysis, occur a determine.

A taky mým rodičům, že mi umožnili stát se tím, kým jsem, a i když o mě měli strach, tak mi nikdy nezakázali uskutečnit moje šílené výlety.

OBSAH

1	ÚVOD	5
1.1	Lymeská nemoc (LN)	5
1.1.1	Borelie – patogen	5
1.1.2	Klíště – přenašeč	6
1.1.3	Příznaky	6
1.2	Imunitní odpověď na infekci boreliemi	7
1.2.1	Úloha dendritických buněk	8
1.3	Únik borelie imunitnímu systému	9
1.4	Imunitní odpověď na sání klíštěte	10
1.5	Efekt slin na modulaci imunitní odpovědi	11
2	CÍLE PRÁCE	14
3	MATERIÁL A METODIKA	15
3.1	Materiál	
3.1.1	Pokusná zvířata	15
3.1.2	Klíšťata a sliny	15
3.1.3	Borelie	15
3.2	Metody	
3.2.1	Izolace dendritických buněk magnetickou separací	15
3.2.2	Aktivace dendritických buněk	16
3.2.3	Izolace CD4 T lymfocytů magnetickou separací	16
3.2.4	Aktivace CD4+ T lymfocytů	17
3.2.5	Měření proliferace T-lymfocytů	17
3.2.6	Měření produkce cytokinů – ELISA	18
3.2.7	Fagocytóza	19
3.2.8	Statistické vyhodnocení dat	19
4	VÝSLEDKY	20
4.1	Vliv slin na procento fagocytujících buněk	20
4.2	Vliv slin na produkci cytokinů dendritickými buňkami	20
4.3	Vliv slin na aktivaci CD4 T lymfocytů	25
4.3.1	Produkce IL2	25
4.3.2	Proliferace CD4 T-lymfocytů	25
5	DISKUZE	27
6	LITERATURA	30

1. ÚVOD

1.1 Lymeská nemoc (LN)

Lymeská nemoc je nejčastější členovci přenášenou lidskou infekcí na světě. Poprvé byla popsána v Americe v roce 1977 (Steere 1977) na pacientech s otoky velkých kloubů a zrudnutím kůže. Nemoc však byla popsána pouze jako soubor klinických příznaků s podezřením, že je přenášena členovci. Až v roce 1982 se Willymu Burgdorferovi podařilo dokázat, že spirochety izolované z klíštěte *Ixodes dammini* (*I. scapularis*) jsou původci Lymeské nemoci.

1.1.1 Borelie – patogen

Borrelia burgdorferi je patogenem způsobujícím onemocnění Lymeskou boreliózou. Jsou to spirochéty třídy Spirochaetae, řádu Spirochaetales, čeledi Spirochaetaceae a rodu *Borrelia*. Nejméně čtyři subtypy komplexu *B.burgdorferi* sensu lato jsou patogenní pro člověka: *B.burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. spielmanii* (Wilske et al., 2007) *Borrelia burgdorferi* je mikroaerofilní bakterie dlouhá 4 - 30 μm, široká 0,2 μm. Borelie jsou ohebné spirálovité bakterie skládající se z protoplazmatického cylindru obklopeného buněčnou membránou a vnější mnohovrstevnou membránou, která je volně spojena s ostatními strukturami (Johnson, 1977). Periplazmatický prostor obsahuje vrstvu peptidoglykanu (Barbour a Hayes, 1986), proto jsou borelie řazeny mezi gram-negativní bakterie, přestože výsledek barvení je pozitivní. V periplazmatickém prostoru je ukotveno na bazálních discích 7 – 11 bičků, které celou spirochétu pod vnější stěnou obtáčejí (Barbour and Hayes 1986). Rotačním pohybem bičků pak dochází k pohybu celé spirochéty. Tyto bičky nejenže bakterii umožňují pohyb, ale jejich umístění je výhodné, protože bičky, které jsou normálně antigenní, jsou ukryty před imunitním systémem hostitele.

Antigenní proteiny vnější membrány borelií vykazují velkou variabilitu a adaptabilitu. Jejich exprese se mění podle životního stádia bakterie a podmínek, ve kterých se nachází.

Tyto proteiny nejsou kódovány na chromozomu borelií, ale na plazmidové DNA. Na plazmidech kódované adhesiny a *vlse*, *crasp* a *osp* geny jsou zodpovědné za invazivitu a únik před imunitním systémem hostitele. (Baranton, 2009)

Exprese genu *OspA* je u borelií v klíštěti nejprve vysoká a po přisátí klíštěte klesá (Schwan et al. 1995), naopak exprese *OspC* je v klíštěti nízká a při přechodu do savčího hostitele se zvyšuje (Srivastava, 2008). *OspA* poskytuje borelii ochranu před protilátkami imunních hostitelů během sání klíštěte a není důležitý pro přežívání v klíštěti (Battisti et al., 2008).

1.1.2 Klíště – přenašeč

Přenašeči Lymeské nemoci jsou klíšťata rodu *Ixodes*. V Evropě je to především *I. ricinus*, jehož biotop se díky globálnímu oteplování rozšiřuje na sever a do vyšších nadmořských výšek. (Danielová et al., 2006; Ogden et al., 2006). Obvyklým hostitelem těchto klíšťat jsou hlavně hlodavci a také zajíci, ještěrky, ptáci, jeleni a srnci. Hlavním zdrojem nákazy pro člověka jsou nymfy (Gray et al. 1999). V přírodních podmínkách trvá vývoj klíštěte 2 – 3 roky, výjimečně za nepříznivých podmínek (nedostatek potravy) i 5 – 6 let. Dospělá samička klíštěte klade několik tisíc vajíček, z nichž se nejprve vylíhnou larvy se třemi páry nohou. Larvy cizopasí zpravidla na drobných obratlovcích. Po nasátí hostitele opouštějí a v opadance dochází k jejich přeměně na nymfy, které mají čtyři páry končetin stejně jako dospělí jedinci. Po nasátí krve na dalším hostiteli se nymfy přemění na dospělé. Dospělá samička může sát na svém hostiteli poměrně dlouho, 5 až 12 dní, a její tělo se díky nařasené kutikule může až třistakrát zvětšit. Při sání na hostiteli probíhá i páření. Oplodněná samička naklade vajíčka a po několika dnech hyne. Všechna tři životní stadia tedy sají krev jen jednou na různých hostitelích a po nasátí hostitele opouští (Walker, 2001).

Kromě borelií přenáší *I. ricinus* i prvoky *Babesia microti* a bakterie *Anaplasma phagocytophilum*, které způsobují babesiosu a lidskou granulocytovou anaplasmosu (HGA) a virus klíšťové encefalitidy.

1.1.3 Příznaky

Lymeská nemoc napadá mnoho orgánů a soustav a vyvolává široké spektrum symptomů. Inkubační doba od nakažení do objevení se prvních příznaků je obvykle jeden až dva týdny, ale může být mnohem kratší (dny) i mnohem delší (měsíce až roky). Nejčastějším klinickým příznakem boreliové infekce je erythema migrans, červená skvrna i několik centimetrů velká, která se v místě přisátí klíštěte objevuje za 2 – 4 týdny. Pacienti mohou mít také chřipkové symptomy jako bolest hlavy a svalů, horečka a únava (Auwaerter et al., 2004). Pokud se neléčí, infekce diseminuje, a erythema migrans se může objevit i na jiných místech těla, která nesouvisejí s přisátím klíštěte (Dandache et al., 2008). Dalšími příznaky, které se mohou objevit, jsou bolesti kloubů a šlach, nepravidelnost srdečního rytmu, závrať a široké spektrum neurologických příznaků jako lehká ztráta paměti, poruchy spánku nebo změny nálady (Steere et al., 2004). Většina pacientů s Lymeskou nemocí má jen některé ze známých symptomů a řada symptomů není specifická pro LN, ale může se objevit i u jiných onemocnění.

Pokud se infekce neléčí několik měsíců, dostává se do třetího stádia, kdy se objevují chronické symptomy, které postihují mnoho částí těla jako mozek, periferní nervy, oči a srdce. Pozdním stádiem neléčené infekce *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii* je neuroborelioza (Wilske et al., 1994; Ornstein et al., 2001). Boreliemi způsobená artritida obvykle postihuje kolena (Puius et al., 2008), ale může napadnout i ostatní klouby.

Asymptomatické infekce existují, objevují se v méně než 7% případů v USA (Steere et al., 2003) ale mohou být mnohem častější v Evropě (Fahrer et al., 1998). Diagnóza se stanovuje na základě klinických příznaků, ve 2. a 3. stádiu se vyšetřují specifické protilátky. U dospělých se léčí doxycyklinem, u dětí amoxicilinem. Standardní léčbou neuroboreliozy jsou cephalosporiny třetí generace. Ve většině případů je infekce eliminována antibiotiky, zvláště pokud se s léčbou začne včas (Steere et al., 2004).

1.2 Imunitní odpověď na infekci boreliemi

V prvních 24 hodinách po přisátí infikovaného klíštěte je pravděpodobnost přenosu borelií do hostitele poměrně malá, protože borelie migrují ze střeva do klíštěcích slinných žláz až po kontaktu s nasátou krví (Steere et al., 2004).

Důležitou roli v zabíjení invadujících mikrobů hraje komplementová kaskáda, která může být spuštěna klasickou, alternativní nebo lektinovou cestou. Přítomnost bakteriálních povrchů vede k aktivaci alternativní cesty a štěpení faktoru C3 alternativní C3-konvertázou na C3a a C3b. Vzniklé fragmenty C3b se kovalentně zachycují na povrchu buněk a slouží jako významné opsoniny, zatímco C3a funguje jako chemotaktin pro fagocytující buňky. Z některých molekul C3-konvertázy vznikají složitější komplexy C5-konvertázy, která štěpí C5 na C5b a menší C5a, což je první krok ke zformování komplexu atakujícího membránu (membrane attack complex, MAC). Zformování MAC na povrchu mikroorganismu vede k lýze buňky.

První buňky nespecifické imunity, které se dostanou na místo infekce *B. burgdorferi* jsou monocyty, ale tyto buňky nejsou schopné pohltnout a zabít neopsonizované spirochety (Lusitani et al., 2002; Montgomery et al., 2002). Naproti tomu makrofágy fagocytují spirochety coiling fagocytózou (Rittig et al., 1992) a zabíjí je pomocí kyslíkových radikálů a oxidu dusnatého (Modolell et al., 1994). Jako reakci na přítomnost borelií začnou makrofágy produkovat interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), který stimuluje maturaci B-lymfocytů (Habicht et al., 1985), a tumor necrosis faktor (TNF), který se účastní zánětlivé odpovědi (Radolf et al., 1991; DeFosse and Johnson, 1992).

1.2.1 Úloha dendritických buněk

Dendritické buňky (DC) mají jedinečnou úlohu v imunitní odpovědi – spojují nespecifickou a specifickou imunitu (Steinman, 1991). Jsou to nejvýznamnější antigen prezentující buňky (Ekerfelt et al., 1997; Filgueira et al., 1996; Yssel et al., 1991). Vyuvíjejí se z CD34+ progenitorových buněk, které migrují z kostní dřeně krevním oběhem do orgánů (Galy et al., 1999)

Dendritické buňky jsou strategicky rozmístěny ve všech orgánech těla, čímž je zvýšena pravděpodobnost jejich rychlého setkání s invadujícími mikroorganismy. Naivní DC v tkáních kontinuálně odebírají vzorky antigenů ve svém okolí pomocí fagocytózy, makropinocytózy, receptorem zprostředkované endocytózy nebo přímým kontaktem s apoptickými nebo infikovanými buňkami (Albert et al., 1998; Bancherau a Steinman, 1998). Na rozdíl od profesionálních fagocytů není jejich hlavním úkolem ničit patogeny, ale prezentovat antigeny patogenů imunitnímu systému. Po obdržení signálu buď přímo od patogenů, nebo prostřednictvím zánětu, DC přepnou expresi chemokinových receptorů, což jim umožní opustit periferní tkáň a migrovat do spádových lymfatických uzlin. Tam je dokončen proces maturace a DC získají schopnost aktivovat naivní T-lymfocyty (Steinman, 1991).

Výrazný podnět pro aktivaci dendritických buněk rozptýlených v tkáních, jsou mikrobiální povrchy, jejich degradované produkty a také mikrobiální nukleové kyseliny, bohaté na úseky CpG. Mezi aktivátory DC patří nejen komponenty mikroorganismů, ale i faktory produkované při poškození tkáně a zánětlivé cytokiny. DC mají na svém povrchu specializované receptory, tzv. pattern-recognition receptors (PRR), které rozeznávají specifické struktury patogenů (tzv. pathogen-associated molecular patterns, PAMP).

Mezi nejvýznamnější PRR patří Toll-like receptory (TLR) (Netea et al., 2004) a lektiny (např. manosový receptor, DEC-205 a DC-SIGN) (Mahnke et al., 2000; Geijtenbeek et al., 2000). TLR důležité pro rozpoznání bakterií jsou TLR1 (triacyl lipopeptidy; bakterie, mykobakterie), TLR2 (lipoproteiny, peptidoglykany, kys. lipoteichoová, zymosan, poriny; hlavně gram-pozitivní bakterie), TLR4 (LPS, heat shock proteiny, fibrinogen; gram-negativní bakterie), TLR5 (flagellin), TLR9 (CpG). U myši, lipopolysacharid (LPS) *Escherichia coli* přenáší signál přes TLR4, zatímco komponenty buněčné stěny gram-pozitivních bakterií a peptidoglykany *Stafylokokus aureus* přenáší signál přes TLR2 (Underhill et al., 1999), který se také účastní přenosu signálu *B. burgdorferi* (Hirschfeld et al., 1999). DC fagocytují *B. burgdorferi* (Filgueira, 1996). *In vitro* fagocytóza začíná 10 minut po přidání borelií k buňkám, spirochety jsou pohlcovány buď tube-fagocytózou (obtočením bakterie úzkým trubicovitým pseudopodiem) nebo coiling-fagocytózou (DC se přichytí ke středu bakterie a

překryje jí širokým pseudopodiem). DC jsou schopné fagocytovat i více borelií najednou. Borelie jsou poté štěpeny na malé fragmenty a indukují maturaci DC. (Suhonen et al., 2003).

V průběhu migrace do lymfatických uzlin dendritické buňky maturují a mění se fenotypově i funkčně. DC v lymfatických tkáních již nejsou schopny pohlcovat antigeny ani fagocytózou ani makropinocytózou. V lymfatických tkáních exprimují DC mimořádně vysoké množství stabilních MHC molekul II třídy, které jsou nezbytné pro prezentaci antigenních fragmentů T lymfocytům. Internalizované antigeny nejsou jako u makrofágů úplně rozštěpeny až na aminokyseliny. Naopak, nezralé DC jsou schopné díky MHC bohatým kompartmentům (MIIC) vytvářet velké množství MHCII-peptid komplexů (Pierre et al., 1997; Najman et al., 1995; Winzler et al., 1997). Během maturace DC se MIIC přemění na nelyzozomální vezikul a MHC-peptid komplexy jsou transportovány na povrch buňky (Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997).

Během maturace DC přestává přijímat antigeny z okolí a dochází ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD40, CD54, CD80 a CD86 (Peguet-Navaro et al., 1995; Sallusto a Lanzavecchia, 1994). V lymfatických uzlinách se DC usadí v parakortikální oblasti bohaté na T-lymfocyty jako interdigitující DC. Ty exprimují adhezní molekuly, nespecificky shlukují s T-lymfocyty a pomocí MHCII prezentují antigen. Antigen specifické T-lymfocyty se pomocí TCR (T-cell receptor) naváží na MHCII a když jsou přítomny i kostimulační molekuly, dojde ke klonální proliferaci T-lymfocytů a produkci cytokinů. Navázané lymfocyty zpátky ovlivňují DC prostřednictvím interakce MHC-TCR a CD40-CD40ligand a podporují tak stimulační funkci DC (Cella et al., 1996).

Výsledkem uvedených interakcí je klonální expanze T a B lymfocytů se všemi efektorovými a regulačními důsledky pro imunitní odpověď. Imunitní odpověď je ukončována apoptózou dendritických buněk v lymfatických uzlinách.

1.3 Únik borelie imunitnímu systému

B. burgdorferi exprimuje v průběhu infekce různé geny, které jí pomáhají zmírnit nebo úplně zastavit útoky imunitního systému hostitele. Exprese těchto genů se mění jak v průběhu infekce tak v závislosti na tkáni hostitele, ve které se borelie nachází (Narasimhan et al., 2003). První překážka, se kterou se *B. burgdorferi* po vstupu do hostitele setká, je reakce nespecifického imunitního systému, v první řadě zabíjení spirochét komplementem. Mnoho bakterií, jako *Streptococcus pneumoniae* (Neeleman et al., 1999) a *Neisseria meningitidis* (Ram et al., 1999), si vyvinulo mechanismy, které inhibují komplementem zprostředkované zabíjení tím, že navážou plazmatický faktor H z hostitele nebo faktor-H-like (FHL) protein,

což vede k degradaci C3b složky komplementu zprostředkované I-faktorem. *B. burgdorferi* využívá k navázání faktoru H nebo FHL proteinu tzv. complement regulator-acquiring surface proteins (CRASP), (Kraiczy et al., 2001) a proteiny příbuzné Osp E/F (Erp), (Hellwage et al., 2001; Alitalo et al., 2001, 2002), Schopnost inhibovat komplement se liší mezi jednotlivými kmeny borelií (Kurtenbach et al., 1998). Na H faktor savčích hostitelů se mohou vázat s různou afinitou i proteiny Erp a mohou tak inhibovat komplementem zprostředkované zabíjení, což umožňuje boreliím přežívání v savčí části životního cyklu (Stevenson et al., 2002)

V časně fázi infekce *B. burgdorferi* exprimuje několik genů, které by mohly být důležité pro její přežívání. Například decorin vázající protein A a B (DbpA a B), (Guo et al, 1995) a fibronectin vázající protein BBK32 (Suk et al., 1995) se váží na decorin a fibronectin v extracelulární matrix hostitele, jak bylo ukázáno v několika studiích (Guo et al., 1995; Probert a Johnson, 1998). Vazba na extracelulární komponenty hostitele by mohla pomáhat v přežívání několika prvních spirochet, které se přenesou po přisátí klíštěte (Fikrig et al., 2000). U myší deficientních na decorin byly po infekci *B. burgdorferi* prokázány nižší počty borelií v tkáních a menší projevy artritidy než u kontrolních myší (Brown et al., 2001).

Při diseminované infekci potřebují borelie oslabit reakci specifického imunitního systému hostitele. Jedním z mechanismů je rekombinace v lokusu variable major protein-like sekvence (*vls*), (Anguita et al., 2001; Zhang et al., 1997). Tento lokus se skládá z místa pro expresi lipoproteinu VlsE a 15 neexprimovaných míst. Při infekci hostitele se neexprimovaná místa náhodně rekombinují do *vlsE* genu a zvětšují tím variabilitu VlsE proteinu. U infikovaných myší i u lidských pacientů byla zjištěna silná protilátková reakce proti konzervovaným částem VlsE proteinu, antigenní variabilita VlsE proteinu tak může chránit spirochéty před zničením zprostředkovaným anti-VlsE protilátkami. Rekombinace je pravděpodobně spuštěna zánětlivou odpovědí hostitele, u borelií v klíšťatech nebyla zjištěna žádná variabilita VlsE proteinu (Hovius et al., 2007).

1.4 Imunitní odpověď na sání klíštěte

V místě přisátí klíštěte vzniká výrazná zánětlivá reakce. Antigenní látky z klíštěcích slin jsou v kůži zachycovány dendritickými buňkami, které po migraci do lymfatických uzlin prezentují antigeny T-lymfocytům. T-lymfocyty se diferencují na CD4+ (pomocné) a CD8+ (cytotoxické) lymfocyty. CD4+ se dále rozdělují podle vlastností a účinku produkovaných

cytokinů na Th1 a Th2 (Mosmann a Hoffman, 1989). Pro Th1 lymfocyty je typická sekrece IL-2, IL-12, TNF- α a IFN- γ , pro Th2 lymfocyty IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. Při reakci na sání klíštěte jsou důležité Th1 buňky, jejichž cytokiny ovlivňují další lymfocyty a myeloidní buňky a také chemotakticky působí na neutrofilů, monocytů, makrofágů, bazofilů a eozinofilů. To vede ke vzniku kožní bazofilní hypersenzitivity, která je formou oddálení přecitlivělosti u imunních jedinců. (Mosmann a Coffman, 1989). Dochází tak k produkci IgG a IgE, které se vážou na Fc receptory bazofilů a žírných buněk a tím je senzibilizují (Christe et al., 1998). Volné protilátky po kontaktu s cirkulujícími antigeny slin aktivují komplement klasickou cestou. Další důležitou složkou imunitní reakce na sání klíštěte je aktivace komplementu alternativní cestou, při které dochází k uvolnění anafylatoxinů. Ty pak způsobí degranulaci bazofilů a žírných buněk, při níž se uvolní látky jako histamin a serotonin. Histamin inhibuje sání a může vést až k odpadnutí klíštěte (Paine et al., 1983). V případě, že je hostitel imunní, vede zánětlivá odpověď až k poškození trávicího traktu klíštěte, ztrátě hmotnosti, inhibici kladení vajec a může způsobit i smrt (Wikel, 1982).

1.5 Efekt slin na modulaci imunitní odpovědi

Jelikož klíště potřebuje k nasátí až 12 dní, musí se v místě přisátí bránit neustálému útoku imunitního systému hostitele. Hlavní roli hrají látky obsažené ve slinách klíštěte, které zabraňují srážení krve, potlačují zánět a suprimují různé imunitní mechanismy. Proti srážení krve obsahují klíštěcí sliny antikoagulanty, které inhibují faktor Xa nebo trombin (Wikel, 1996). U *I. scapularis* byly objeveny proteiny Ixolaris, inhibující aktivaci faktoru X přes tkáňový faktor a faktor VIIa (Francischetti et al., 2002) a Salp14, inhibitor faktoru Xa (Narasimhan et al., 2002). Dále se v klíštěčích slinách nachází apyráza a disagregin, bránící shlukování krevních destiček (Karczewski et al., 1994). Histamin vázající proteiny (HBP) přítomné ve slinách blokuje účinky histaminu a serotoninu uvolněných z granul bazofilů a žírných buněk (Paesen et al., 1999).

Kromě toho si klíšťata vyvinula široké spektrum imunomodulačních proteinů, vylučovaných v jejich slinách, které jim umožňují sát po dlouhou dobu, aniž by byla objevena imunitním systémem hostitele. Jedním z nich jsou evasiny – proteiny, které se selektivně vážou na chemokiny, které by jinak aktivovaly buňky nespecifické imunity, a neutralizují je. (Déruaz, 2008).

Extrakt ze slinných žláz *Dermacentor reticulatus* sajících na klíštěti 6 dní snižuje aktivitu lidských NK (natural killers) buněk (Kubeš et al., 1994). NK buňky se sníženou aktivitou produkují menší množství $IFN\gamma$, důležitého Th1 cytokinu, a tak se imunitní odpověď posouvá směrem k Th2.

Sliny klíšťat dokáží inhibovat i protilátkovou reakci hostitele, obsahují totiž proteiny, které se na protilátky váží a tím je neutralizují. Poprvé byl IgG vázající protein objeven ve slinách klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Wang a Nuttall, 1994)

Bylo prokázáno, že sliny snižují schopnost makrofágů produkovat interleukin 1 a tumor necrosis factor alfa (Ramachandra a Wikel, 1992, 1995). Jak SGE, tak sliny prokazatelně snižují u makrofágů schopnost fagocytovat *B. afzelii* i produkovat prozánětlivé cytokiny (Kýčková, 2006). Stejně taky snižují i zabíjení bakterií v makrofázích a suprimují i produkci dvou hlavních obranných molekul fagocytárních buněk – NO a superoxidového aniontu (Urioste et al., 1994; Ferrara a Silva, 1998; Kuthejlová et al., 2001). Sliny rovněž potlačují funkci neutrofilů, snižují fagocytózu *B. burgdorferi*, agregaci neutrofilů i produkci superoxidu (Ribeiro et al., 1990)

Sliny klíšťat ovlivňují i funkci T-lymfocytů (Wikel et al., 1996). Proteiny slin jsou zodpovědné za snížení proliferace T-lymfocytů in vitro (Urioste et al., 1994; Ferreira a Sliva, 1999), také produkce interleukinů spojená s pomocnými Th1 lymfocyty, IL2 a interferon gama, byla významně snížena, když byly lymfocyty ovlivněny působením extraktu z klíštěcích slinných žláz (SGE, Ramachandra a Wikel, 1992, 1995). Snížení proliferace T-lymfocytů, stejně jako snížení hladiny IL-2 může být způsobeno IL-2 vázajícím proteinem (IL-2BP) identifikovaným ve slinách *I. scapularis*, který váže lidský i myší IL-2 (Gillespie et al., 2001). Pokud hladina Th2 cytokinů snížena není, dochází k polarizaci imunitní reakce ve prospěch Th2 buněčné odpovědi, která na rozdíl od kožní hypersenzitivity zprostředkované Th1 cytokiny, není proti klíšťatům příliš účinná.

Ve slinách amerického přenašeče boreliózy *I. scapularis* byl nalezen protein Salp15, který se váže na povrchový protein borelie OspC a tím ji chrání před protilátkami hostitele (Ramamoorthi et al., 2005), následně byl analog tohoto proteinu identifikován i u evropského hostitele *I. ricinus* (Hovius et al., 2008a). Salp15 je jedním z hlavních imunomodulačních proteinů ve slinách klíštěte. Bylo dokázáno, že se váže na CD4 receptor a tím inhibuje jím přenášené signály, což vede k narušení produkce IL2 a proliferace CD4+ T lymfocytů. (Anguita et al., 2002; Garg et al., 2006; Juncadella et al., 2007). Hovius a kolektiv (2008b)

objevili, že Salp15 se váže i na dendritické buňky prostřednictvím lektinu DC-SIGN, což způsobí aktivaci Raf-1 kinázy, jejímž výsledkem je snížení stability mRNA pro TNF- α a IL-6 a způsobuje špatnou remodelaci nukleosomu v místě promotoru pro IL-12p35. Navázání Salp15 na DC-SIGN spouští řadu reakcí, kterými ovlivňuje transkripci i postranskripční úpravy cytokinů a tím působí proti aktivaci DC zprostředkované Toll-like receptorem.

Sliny klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* inhibují diferenciaci DC z buněk kostní dřeně, snižují i počet diferencovaných naivních DC a snižují jejich schopnost stimulovat tvorbu cytokinů specifickými T-lymfocyty (Cavassani et al., 2005)

Usnadněný je i přenos patogenů z jednoho přenašeče na druhého, tato skutečnost se označuje termínem slinami aktivovaný přenos (saliva-activated transmission, SAT). Poprvé byl popsán u viru Thogoto a jeho vektora *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al., 1987), kdy neinfekční klíšťata sající společně s infikovanými na jednom morčeti se nakazila virem, přestože nebyla zjevná virémie. Neviremický přenos patogenů je považovaný za nepřímý důkaz SAT efektu. Přímým důkazem slinami aktivovaného přenosu je zvýšená infektivita patogena při jeho inokulaci zároveň s extraktem ze slinných žláz nebo slinami.

Dosud byl SAT přímo i nepřímo prokázán u mnoha patogenů a jejich vektorů, například jsou to virus klíšťové encefalidity a *Ixodes ricinus*, resp. *I. persulcatus* (Labuda et al., 1993, Alekseev a Chunikhin, 1990), *Francisella tularensis* a *I. ricinus* (Kročová et al., 2003) nebo *Leishmania* spp. a *Phlebotous* (Titus a Ribeiro, 1988). U rodu *Borrelia* byl slinami aktivovaný přenos prokázán u *B. burgdorferi* sensu strigo a *I. scapularis* (Gern a Rais, 1996; Patrican 1997, Zeidner et al., 2002), *B. burgdorferi* sensu stricto a *I. ricinus* (Macháčková et al., 2006), *B. lusitaniae* a *I. ricinus* (Zeidner et al., 2002), *B. afzelii* a *I. ricinus* (Pechová et al., 2002; Richter et al., 2002) a *B. garinii* a *I. persulcatus* (Sato a Nakao, 1997). Klíštěcí sliny také ovlivňují šíření *B. burgdorferi* v těle myši a zvyšují jejich přenos z myši na klíšťata. (Horká, 2009) Za SAT jsou pravděpodobně odpovědné některé z imunomodulačních molekul, ale ty se mohou pro různé patogeny a vektory lišit (Zeidner et al., 2002).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Stanovení vlivu klíštěcích slin na cytokinový profil myších dendritických buněk infikovaných spirochétami *B. afzelii*
- 2) Měření vlivu expozice myších dendritických buněk spirochétám *B. afzelii* a klíštěcím slinám na schopnost stimulovat specifické paměťové T-lymfocyty
- 3) Stanovení míry fagocytózy borelií dendritickými buňkami v přítomnosti klíštěcích slin

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

3.1.1 Pokusná zvířata

Inbrední myši kmene C3H/HeN (6- 10 týdnů staré samice) byly zakoupeny od firmy Anlab. Byly chovány za standardních podmínek v chovech na Parasitologickém ústavu Bilogického centra AVČR v Českých Budějovicích.

3.1.2 Klíšťata a sliny

Samice *Ixodes ricinus*, které sály 6-7 dní na morčatech, byly přilepeny na podložní sklíčka. Produkce slin byla vyvolána kápnutím 2 μ l roztoku pilocarpinu (33 μ g/ml v 96% ethanolu) na dorzální stranu klíštěte. Sliny byly sbírány do skleněné kapiláry umístěné na hypostom a 1 palpu každého klíštěte. Klíšťata byla po dobu 1 hodiny inkubována ve vlhké komůrce při 37°. Nashromážděné sliny byly přefiltrovány přes 0,22 μ m filtr a skladovány v -80°C. Koncentrace celkového proteinu byla měřena podle Bradfordové..

3.1.3 Borelie

V pokusu byly použity bakterie *Borrelia afzelii* z kmene CB-43, izolované ze samic *Ixodes ricinus* (Štěpánová-Tresová, 1999), pěstované v Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK-H) mediu (Sigma) s 6% králičím sérem při 33°C. Před každým pokusem byly bakterie spočítány pomocí mikroskopie v temném poli, bylo odebráno požadované množství borelií, stočeno při 10 000 RPM a resuspendováno v kultivačním mediu pro buňky.

3.2 Metody

3.2.1 Izolace dendritických buněk magnetickou separací

Materiál: kompletní RPMI médium: RPMI médium, 10% bovinní fetální sérum - BOFES

(Sigma), 0,1% merkptoethanol

MACS pufr: PBS, 2% BOFES, 2mM EDTA

Myši kmene C3H/HeN byly usmrceny dislokací vazů a byla jim vypitvána slezina. Ta byla pomocí nůžek homogenizována v Petriho misce a přenesena do Erlenmayerovy baňky spolu se 4ml media RPMI s kolagenázou (1mg/ml, Collagenase D, Roche). Poté byla slezina

inkubována 30 minut ve 37°C na vortexu při nízkých otáčkách. Po 30 minutách bylo odebráno médium s uvolněnými buňkami a přefiltrováno přes 70µm sítko (BD Falcon) do 50 ml zkumavky předchlazené na ledu. Ke zbytku sleziny byly přidány další 4ml RPMI s kolagenázou a směs byla inkubována dalších 30 min ve 37°C. Pak byla celá buněčná suspenze přefiltrována přes 70µm sítko, zcentrifugována při 1500 RPM/10°C/10 minut, promyta v 4 ml MACS pufru, resuspendována v 400µl MACS pufru a bylo přidáno 80µl CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec). Inkubace pobíhala 15 min při 4 °C. Poté byla suspenze promyta v 5 ml MACS pufru, resuspendována v 500µl MACS pufru a nanášena na kolonku (LS MACS Column, Miltenyi Biotec) umístěnou v magnetickém poli a propláchnutou 3ml MACS pufru. Kolonka byla poté propláchnuta 3x 3ml MACS pufru, vyndána z magnetického pole, bylo na ní nanášeno 5ml MACS pufru a okamžitě protlačeno pístem. Vyizolované buňky byly zcentrifugovány při 1500 RPM/10°C/10 minut, resuspendovány v kompletním médiu a spočítány v Bürkerově komůrce.

3.2.2 Aktivace dendritických buněk

Dendritické buňky byly nanášeny na 96-jamkovou destičku s kulatým dnem v množství 2×10^5 buněk v 50µl média na jamku. Jedna skupina byla preinkubována se slinami (10µl/ml, 25µl na jamku), do skupiny „aktivovaných buněk“ bylo přidáno CpG (100nM, 25µl na jamku), do ostatních jamek byl doplněn stejný objem kultivačního média. Buňky byly inkubovány 4 hodiny ve 37°C. Potom byly do vybraných jamek přidány borelie (2×10^6 v 50µl na jamku), klíštěcí sliny (10µl/ml, 25µl na jamku) a do kontrolní skupiny pilocarpin (100µM v 50µl). Do ostatních jamek bylo přidáno stejné množství kultivačního media. Buňky byly opět inkubovány 4 hodiny, po kterých k nim bylo přidáno 50µl média s 1% antibiotiky (Antibiotic-Antimycotic, Sigma). Po 24 hodinách inkubace v 37°C bylo odebráno 100µl supernatantu, který byl zamražen až do dalšího použití, a k buňkám bylo přidáno 30µl média s antibiotiky. Po dalších 24 hodinách byla destička s buňkami zcentrifugována a zbytek supernatantu byl odebrán a zamražen.

3.2.3 Izolace CD4 T lymfocytů magnetickou separací

Materiál: kompletní RPMI médium: RPMI médium, 10% bovinní fetální sérum - BOFES (Sigma), 0,1% merkaptoethanol, 1% antibiotika (Antibiotic-Antimycotic, Sigma)
MACS pufr: PBS, 2% BOFES, 2mM EDTA

Specifické CD4⁺ T-lymfocyty byly izolovány z myši imunizovaných *B. afzelii* (1×10^5 bakterií subkutánně ve 100 μ l BSK média) 4 týdny po infekci. Kontrolní naivní CD4⁺ T-lymfocyty byly izolovány ze zdravých myši. Myši byly usmrceny dislokací vazy a byla jim vyoperována slezina. Z ní byla připravena buněčná suspenze protlačením přes 70 μ m sítko. Získané splenocyty byly zcentrifugovány při 1500 RPM/10°C/10 minut, promyty ve 4 ml MACS pufru, rozsuspendovány v 630 μ l MACS pufru a bylo k nim přidáno 70 μ l CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Inkubace pobíhala 15 min při 4 °C. Poté bylo k suspenzi přidáno 5 ml MACS pufru, byla zcentrifugována při 1500 RPM/10°C/10 minut, resuspendována v 500 μ l MACS pufru a nanесena na kolonku (LS MACS Column, Miltenyi Biotec) umístěnou v magnetickém poli a promytou 3ml MACS pufru. Kolonka byla poté propláchnuta 3x 3ml MACS pufru, vyndána z magnetického pole, a CD4⁺ T-lymfocyty byly vymyty v 5 ml MACS pufru. Vyizolované buňky byly zcentrifugovány při 1500 RPM/10°C/10 minut, resuspendovány v kompletním médiu a spočítány.

3.2.4 Aktivace CD4⁺ T lymfocytů

Dendritické buňky byly nanесeny na 96-jamkovou destičku s kulatým dnem v koncentraci 5×10^4 buněk v 50 μ l média na jamku. Jedna skupina byla preinkubována se slinami (10 μ l/ml, 25 μ l na jamku), do skupiny „aktivovaných buněk“ bylo přidáno CpG (100nM, 25 μ l na jamku), do ostatních jamek byl doplněn stejný objem kultivačního média. Buňky byly inkubovány 4 hodiny ve 37°C. Potom byly do vybraných jamek borelie (5×10^5 , v 25 μ l na jamku), do jedné skupiny byly přidány sliny (10 μ l/ml, 25 μ l na jamku) a do kontrolní skupiny pilocarpin (100 μ M v 50 μ l). Do ostatních jamek bylo přidáno stejné množství kultivačního media. Buňky byly opět inkubovány 4 hodiny, po kterých k nim bylo přidáno 50 μ l média s antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace v 37°C bylo z jamek odebráno medium a k buňkám bylo ve 200 μ l kompletního média přidáno 3×10^5 CD4⁺ T-lymfocytů z myši imunizované boreliemi, nebo z kontrolní naivní myši. T lymfocyty byly s dendritickými buňkami inkubovány 48 hodin při 37°C, poté bylo odebráno 100 μ l supernatantu na stanovení koncentrace IL-2. Po dalších 24 hodinách inkubace byla změřena proliferace T-lymfocytů.

3.2.5 Měření proliferace T-lymfocytů

Proliferace CD4⁺ T-lymfocytů byla měřena pomocí Cell Counting Kitu 8 (Sigma), který využívá WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), který při redukci v přítomnosti nosiče elektronů 1-

Methoxy PMS vyrábí ve vodě rozpustnou formazanovou barvu. Do každé jamky bylo přidáno ke 100 μ l T-lymfocytů inkubovaných 3 dny s různě ovlivněnými dendritickými buňkami 10 μ l Cell Counting Kitt 8 roztoku. Destička byla inkubována 4 hodiny ve 37°C a 5% CO₂, WTS-8 se redukoval buněčnými dehydrogenázami na oranžový formazan, rozpustný v kultivačním médiu. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk. Poté byla změřena absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC/340) při vlnové délce 450nm.

3.2.6 Měření produkce cytokinů – ELISA

3.2.6.1 Stanovení cytokinů TNF- α , IL-6, IL-10 a IL-2

K určení množství cytokinů byly použity komerční ELISA kity pro kvantifikaci cytokinů (eBioscience). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp) podle dodaného návodu.

Nejprve se na dno každé jamky navázala protilátka ředěná 1:250 v objemu 100 μ l a nechala se inkubovat ve vlhké komůrce (uzavřené nádobě se dnem pokrytým navlhčeným filtračním papírem) přes noc při 4 °C. Druhý den byly jamky 5x promyty promývacím roztokem (1x Assay diluent,) a poté do nich bylo nanášeno 200 μ l blokovacího roztoku (1x Assay diluent), který slouží k vyblokování nespecifických míst. Blokování probíhalo 1 hodinu ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Poté byly jamky opět 5x promyty, byly přidány jednotlivé supernatanty testovaných vzorků a rekombinantní protein jako standard v objemu 100 μ l. Standard byl dvojkovou řadou ředěn z 1 ng/ml až na nulovou koncentraci a výsledky byly později využity k sestavení kalibrační křivky. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Následně byly jamky 4x promyty a do každé jamky byla přidána detekční (biotinylovaná) protilátka ředěná 1:250 v objemu 100 μ l. Detekční protilátka se opět inkubovala po dobu 1 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 5x promyty a dále inkubovány se 100 μ l avidin peroxidázy ředěné 1:250, během třiceti minut označila navázanou detekční protilátku. Poté byly jamky 4x promyty a do jamek byl přidán substrátový roztok o objemu 100 μ l a vše bylo ponecháno ve tmě. Peroxid vodíku - substrát pro peroxidázu - uvolnil kyslík, který oxidoval chromogen TMB (tetrametylbenzidin) a vznikla charakteristická barevná reakce. Vývoj barvy byl po 15 minutách zastaven přidáním 100 μ l 2M H₂SO₄ do každé jamky a následně byly odečteny hodnoty absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 450 nm.

3.2.7 Fagocytóza

Příprava sklíček :

Krycí sklíčka 18x18mm byla promyta v 70% ethanolu, opláchnuta destilovanou vodou a ponořena do 1% Alcian Blue, která byla přivedena k varu. Po 10 minutách byla sklíčka opláchnuta destilovanou vodou.

Fixace buněk na sklíčko:

Na připravené obarvené sklíčko bylo nakapáno 10^5 dendritických buněk ve 200 μ l bezsérového RPMI média spolu s 10^6 borelií. K jedné skupině bylo přidáno 50 μ l slin (10 μ g/ml), ke druhé stejné množství média a vzorky byly inkubovány 60 minut ve 37°C ve vlhké komůrce. Pak byla skla 2x promyta 5 minut v PBS a 5 minut v 0,5% želatině. Buňky byly fixovány 10 minut v ledovém acetonu.

Nepřímá imunofluorescence:

Sklíčka s nafixovanými buňkami byla 2x5 minut opláchnuta v PBS a poté na ně bylo nanášeno 50 μ l primární protilátky proti flagelinu (5H4D1) ředěné 1:50 v PBS. Po 30 minutách inkubace ve vlhké komůrce při 37°C byla sklíčka znovu 2x5 minut opláchnuta v PBS a bylo na ně nanášeno 50 μ l sekundární kozí antimyší protilátky značené FITC (Sigma) ředěné 1:500 v PBS. Vzorky byly znovu vloženy ve vlhké komůrce do termostatu a inkubace probíhala 30 minut. Sklíčka byla opět promyta 2x 5 minut v PBS a byla na ně nanášeno 50 μ l anti-CD11c protilátky značené PE (eBioscience) ředěné 1:200 v PBS s 1% bovinním sérem. Další inkubace probíhala 30 minut při laboratorní teplotě. Následovalo další promytí v PBS 2x 5 minut a na sklíčka bylo nanášeno 50 μ l DAPI, a po 5 minutách inkubace byla sklíčka opět promyta 2x 5 minut v PBS. Nakonec na ně byla nanášena kapka DABCO-glycerin a byla naně přiložena krycí sklíčka. Prohlížení preparátů probíhalo pod mikroskopem Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss) při zvětšení objektivu 63x nebo 100x, vybraná místa byla fotografována F-View CCD kamerou.

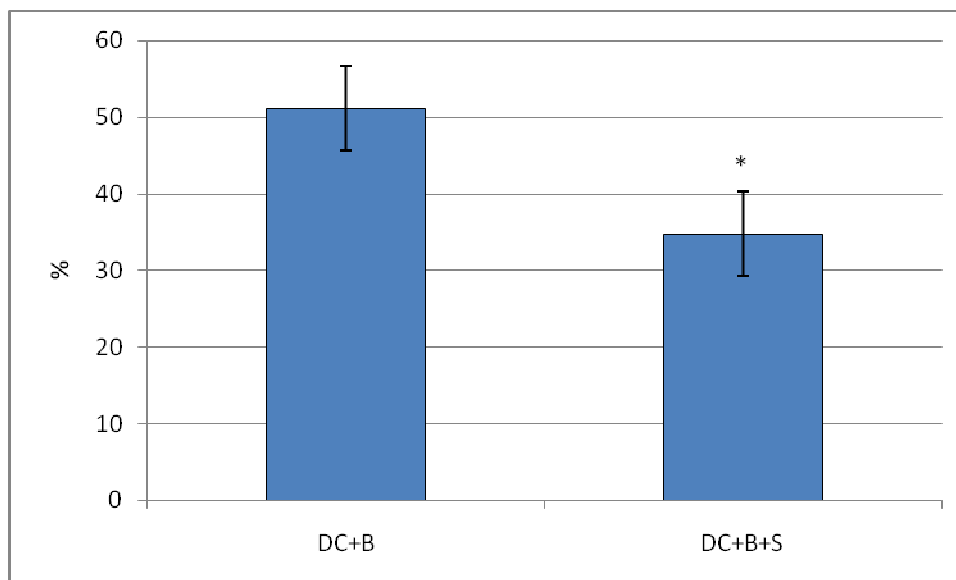
3.2.8 Statistické vyhodnocení dat

Všechny pokusy byly prováděny v triplikacích, v programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které byly použity pro vytvoření grafů. Statistické analýzy probíhaly pomocí analýzy variance (ANOVA) a Tukeyho Post Hoc testu v programu Statistica 8.0. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou v grafech označeny hvězdičkou.

4. VÝSLEDKY

4.1 Vliv slin na procento fagocytujících buněk

Dendritické buňky byly inkubovány 1 hodinu v médiu s boreliemi (1DC: 10 borelií) a s obsahem klíštěcích slin 10 μ g/ml, nebo bez nich. Výsledky znázorňuje graf (Graf 1).



Graf 1: Vliv klíštěcích slin na procento myších dendritických buněk fagocytujících *B. afzelii*. Dendritické buňky byly inkubovány 1 hodinu v médiu s boreliemi (1DC: 10 borelií) a s obsahem klíštěcích slin 10 μ g/ml. * statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

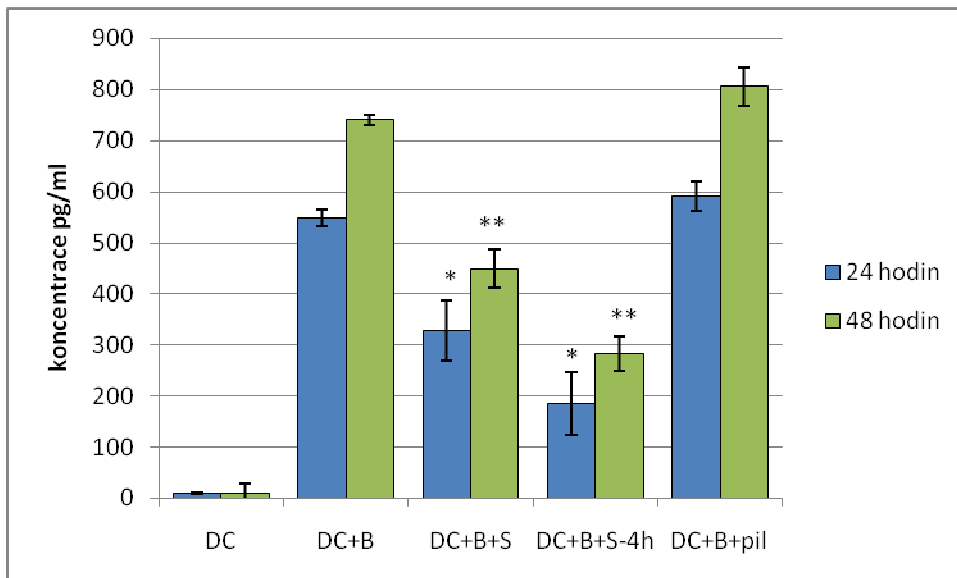
Po hodinové inkubaci obsahovalo spirochéty 51% dendritických buněk neovlivněných slinami, zatímco ve vzorcích inkubovaných se slinami to bylo 35% DC. Vlivem slin tedy došlo ke snížení počtu fagocytujících dendritických buněk o 16%. Inhibiční efekt slin byl průkazný na 5 % hladině významnosti.

4.2 Vliv slin na produkci cytokinů dendritickými buňkami

V tomto pokusu byl měřen vliv slin na produkci interleukinů TNF- α , IL-10 a IL-6 dendritickými buňkami. Jedna skupina DC byla inkubována se slinami o koncentraci 10 μ g/ml 4 hodiny a poté byly do všech skupin buněk kromě kontroly přidány borelie (2×10^6) a do jedné skupiny zároveň i sliny (10 μ g/ml) a do kontrolní skupiny pilokarpin (100 μ M) a inkubace probíhala další 4 hodiny. Poté bylo přidáno médium s 1% antibiotiky.

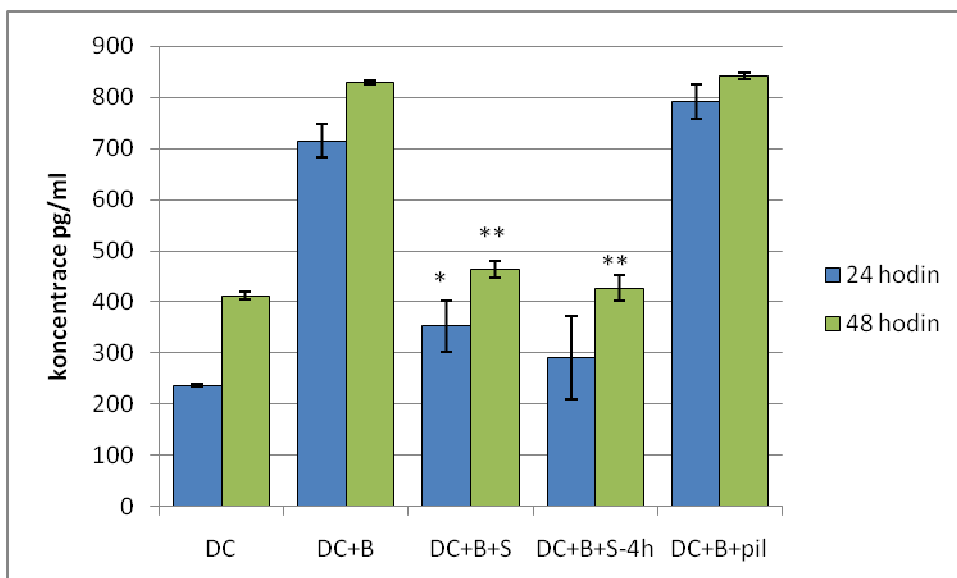
Nestimulované DC prakticky neprodukovaly TNF- α (Graf 2), boreliemi se zvýšila produkce TNF- α 137x (z 4 pg/ml u nestimulovaných na 548 pg/ml) Pod vlivem slin přidávaných zároveň s boreliemi se produkce TNF- α snížila o 41%. Preinkubace DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií vedla ke snížení množství TNF- α v supernatantu o 66%. Kontrolní

skupina s pilokarpinem neukázala změnu v produkci TNF- α ve srovnání se skupinou bez slin.



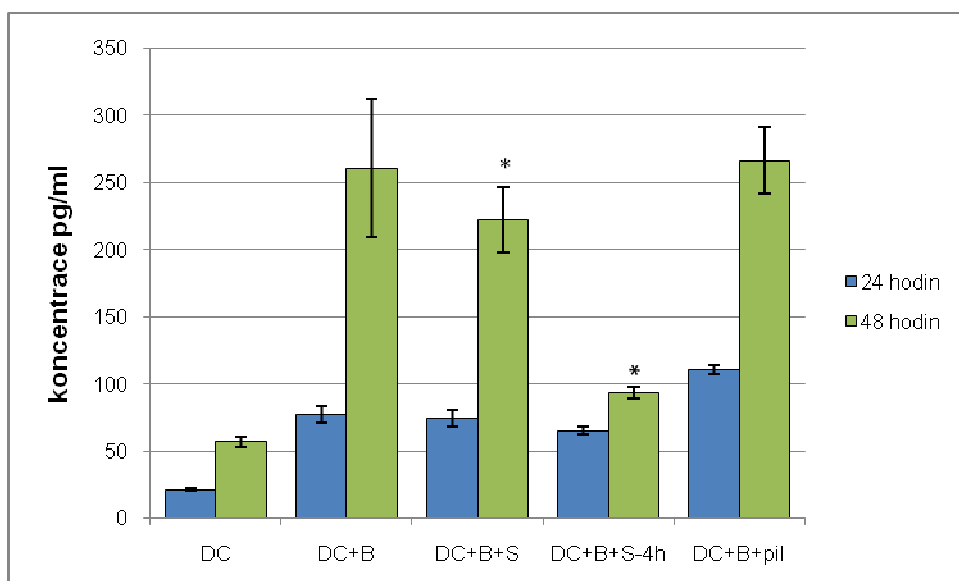
Graf 2: Vliv klíštěcích slin na produkci TNF- α dendritickými buňkami. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h, resp. pouze s médiem. Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB.* statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (24 hodin) .** statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

U buněk aktivovaných CpG byla produkce TNF- α naměřena i bez přítomnosti borelií (59x vyšší než u DC neaktivovaných CpG). Při inkubaci s boreliemi se množství TNF- α zvýšilo 3x. Přidání slin zároveň s boreliemi snížilo produkci TNF- α o 51% a preinkubace DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií vedla ke snížení množství TNF- α v supernatantu o 59%.(Graf 3)



Graf 3: Vliv klíštěcích slin na produkci TNF- α dendritickými buňkami aktivovanými CpG. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h a CpG (100 nM v 25 μ l média). Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1 DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB. .* statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (24 hodin) .** statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

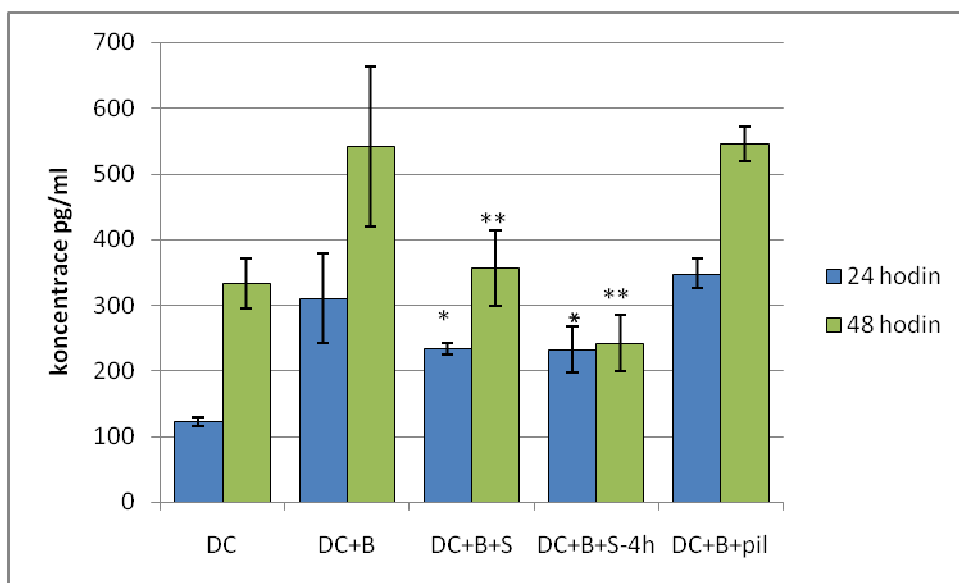
Dendritické buňky produkovaly IL-10 v menší míře už po 24, ale především po 48 hodinách (Graf 4). DC stimulované boreliemi produkovali 260pg/ml IL-10, což je 5x více, než buňky neovlivněné. Inhibiční efekt slin je průkazný jen po 48 hodinách a to jak v případě, že byly borelie i sliny přidány současně (pokles o 15%) tak v případě preinkubace slin s DC 4 hodiny před přidáním borelií (pokles o 65%).



Graf 4: Vliv klíštěcích slin na produkci IL-10 dendritickými buňkami. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h, resp. pouze s médiem. Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l

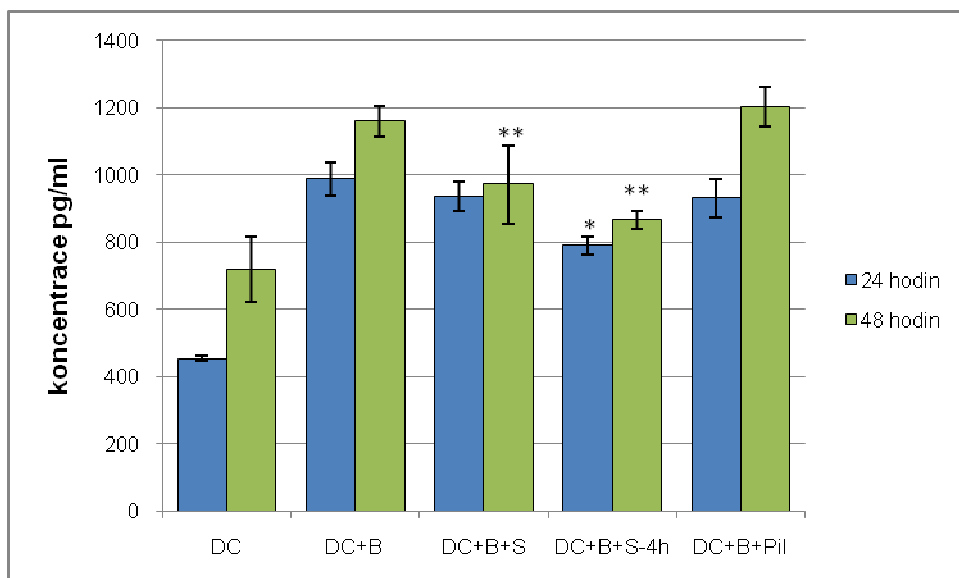
média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB. * statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

U DC aktivovaných CpG se po 24 hodinách inhibiční efekt slin projevil stejně při preinkubaci jako při současném přidání borelií a slin a to snížením množství IL-10 o 25% (Graf 5). Po 48 hodinách bylo snížení ještě výraznější a to o 35% u borelií a slin přidávaných současně a 65% u preinkubace.



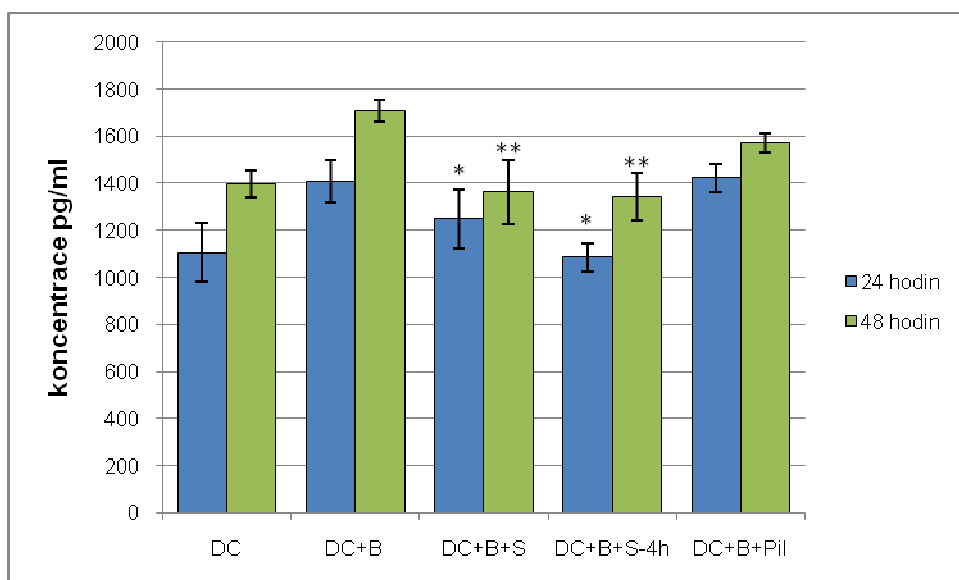
Graf 5: Vliv klíčtčích slin na produkci IL-10 dendritickými buňkami aktivovanými CpG. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíčtčícími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h a CpG (100 nM v 25 μ l média). Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1 DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB. *statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (24 hodin). ** statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

Borelie stimulovaly dendritické buňky k produkci IL-6 (2,1x větší produkce než u buněk nestimulovaných) (Graf 6). V přítomnosti slin se jeho produkce snížila o 6%, v případě preinkubace DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií se množství IL-6 v supernatantu snížilo o 21%. Přítomnost pilokarpinu na produkci IL-6 vliv neměla.



Graf 6: Vliv klíštěcích slin na produkci IL-6 dendritickými buňkami. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h, resp. pouze s médiem. Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB. *statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (24 hodin). ** statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

I DC aktivované CpG byly stimulovány boreliemi ke zvýšené produkci IL-6 (1,3x větší než u buněk nestimulovaných), která se přidáním slin snížila o 12% a preinkubací DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií se množství IL-6 snížilo o 23%.



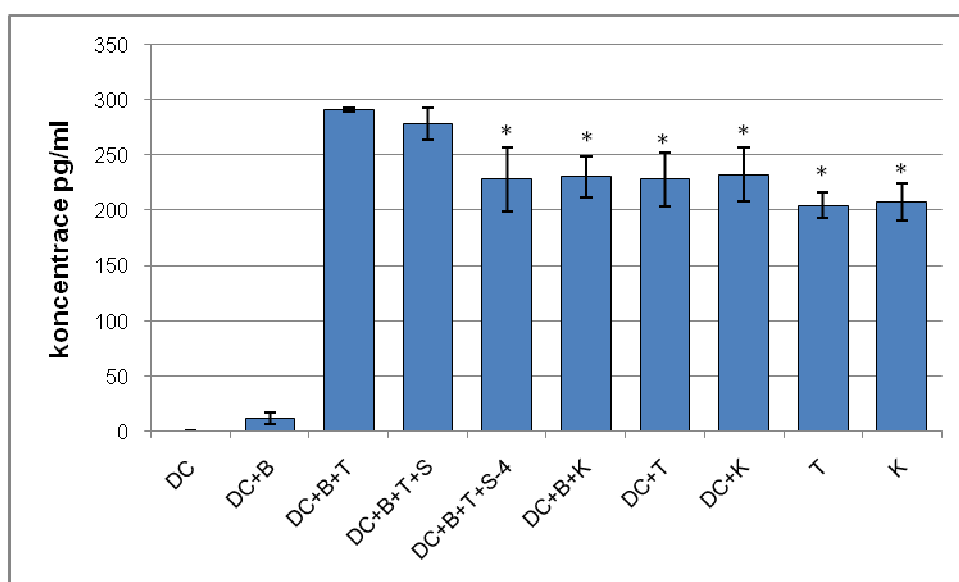
Graf 7: Vliv klíštěcích slin na produkci IL-6 dendritickými buňkami aktivovanými CpG. Buňky (2×10^5 DC v 50 μ l média) byly inkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml v 25 μ l média) – skupina S-4h a CpG (100 nM v 25 μ l média). Po 4 hodinách byly přidány borelie v poměru 1 DC : 10 bor., sliny do skupiny S a pilokarpin (100 μ M v 50 μ l média) do skupiny pil. Po dalších 4 hodinách bylo přidáno 50 μ l média s 1% antibiotiky. Po 24 hodinách inkubace bylo odebráno 100 μ l supernatantu a přidáno 30 μ l média s ATB. *statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (24 hodin). ** statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B (48 hodin)

4.3 Vliv slin na aktivaci CD4 T lymfocytů

V tomto pokusu byl měřen vliv slin na aktivaci CD4 T-lymfocytů dendritickými buňkami. Lymfocyty byly přidány k dendritickým buňkám předem ovlivněným boreliemi a slinami jako v předchozím pokusu. Po 48 hodinách inkubace byla měřena koncentrace IL-2 v odebraném supernatantu (Graf 8) a za dalších 24 hodin byla měřena proliferace buněk v jednotlivých skupinách (Graf 9).

4.3.1 Produkce IL2

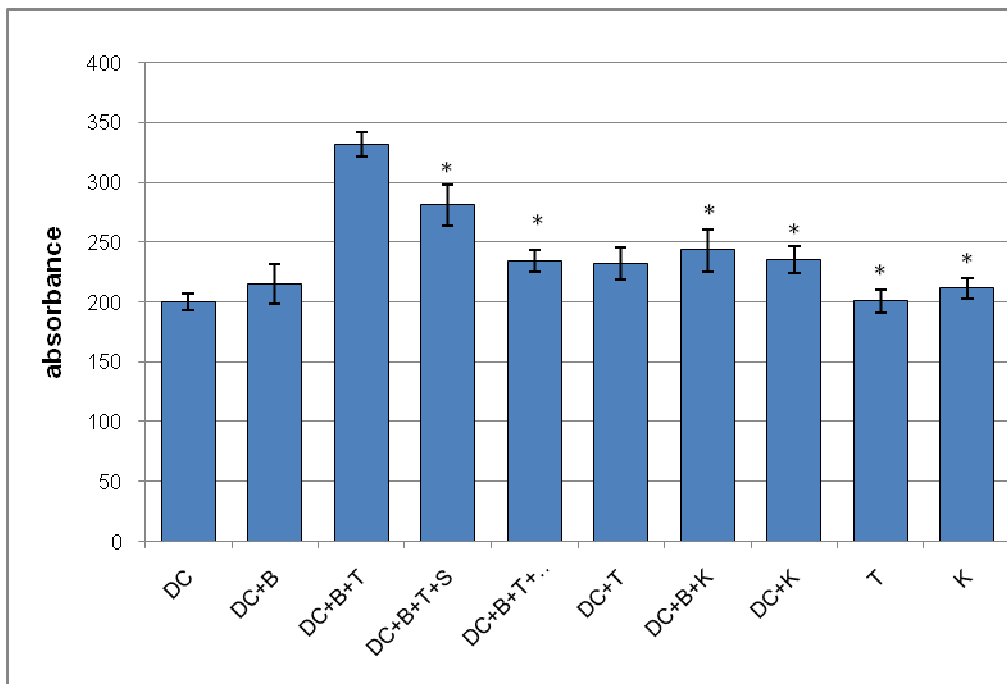
Dendritické buňky inkubované s boreliemi indukují u T-lymfocytů produkci IL-2 o 27% vyšší než DC neovlivněné. Přidání slin snížilo produkci IL-2 o 5% a preinkubace DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií snížilo produkci IL-2 na úroveň kontroly (DC+T). Nespecifické CD4+ T-lymfocyty inkubované s DC ovlivněnými boreliemi neprodukovaly zvýšené množství IL-2 (Graf 8).



Graf 8: Vliv klíčtčích slin na schopnost DC aktivovat produkci IL-2 CD4+ T-lymfocyty. K dendritickým buňkám (5×10^4 v $50 \mu\text{l}$ média) ovlivněným boreliemi (1DC : 10 bor.) a slinami ($10 \mu\text{g/ml}$ v $25 \mu\text{l}$ média) přidány zároveň s boreliemi (skupina S) nebo 4 hodiny před boreliemi (skupina S-4) byly přidány specifické CD4+ T lymfocyty (T) nebo kontrolní CD4+ T-lymfocyty (K), (3×10^5 v $200 \mu\text{l}$ média). Inkubace probíhala 48 hodin. *statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B+T.

4.3.2 Proliferace CD4 T-lymfocytů

Dendritické buňky inkubované s boreliemi indukovaly proliferaci T-lymfocytů (Graf 9). Přidáním slin se proliferace snížila o 14 % a při preinkubaci DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií se množství T-lymfocytů snížilo o 28%.



Graf 9: Vliv klíštěcích slin na schopnost DC aktivovat proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů. K dendritickým buňkám (5×10^4 v $50 \mu\text{l}$ média) ovlivněným boreliemi (1DC : 10 bor.) a slinami ($10 \mu\text{g/ml}$ v $25 \mu\text{l}$ média) přidanými zároveň s boreliemi (skupina S) nebo 4 hodiny před boreliemi (skupina S-4) byly přidány specifické CD4⁺ T lymfocyty (T) nebo kontrolní CD4⁺ T-lymfocyty (K), (3×10^5 v $200 \mu\text{l}$ média). Inkubace probíhala 72 hodin. *statisticky významný rozdíl oproti skupině DC+B+T.

5. DISKUZE

Dendritické buňky jsou významnou součástí imunitního systému. Jako součást nespecifické imunity se vyskytují v mnoha tkáních a neustále „nabírají vzorky z prostředí“, zpracovávají je a prezentují buňkám adaptivní imunity. Tato jejich schopnost přijímat látky ze svého okolí a prezentovat je T-lymfocytům je klíčovým místem v imunitní odpovědi, protože spojuje specifickou a nespecifickou část imunity. V odpovědi na boreliovou infekci je role dendritických buněk nepopíratelná. Poté, co se klíště přisaje na kůži hostitele, borelie se přemístí ze střeva do slinných žláz a poté spolu se slinami do místa vpichu. Odtamtud se šíří do okolní tkáně a jsou fagocytovány buňkami nespecifické imunity, jako jsou makrofágy a dendritické buňky. Ty potom prezentují jejich antigenní součásti specifickým CD4+ T-lymfocytům, které potom aktivují cytotoxické T-lymfocyty nebo B-lymfocyty a ty začnou tvořit protilátky.

Sliny klíštěat usnadňují klíštěatům sání krve, mají antihemostatické, antikoagulační, antihistaminické a imunosupresivní účinky. Borelie dokáží stejně jako jiné patogeny přenášené klíštěaty využívat farmakoaktivních vlastností látek obsažených v klíštěcích slinách ve svůj prospěch.

Z našich pozorování plyne, že spirochéty *B. afzelii* jsou hojně fagocytovány naivními dendritickými buňkami a poté zpracovány na menší fragmenty. Procento dendritických buněk fagocytujících *B. afzelii* bylo vlivem slin sníženo o 32% z 51% fagocytujících buněk při inkubaci DC beze slin na 35% při hodinové inkubaci se slinami. Takto významný pokles ukazuje, že inhibiční efekt proteinů obsažených ve slinách, který už byl sledován na jiných úrovních imunitní odpovědi, se projevuje už v prvních okamžicích po vstupu borelií do těla hostitele. Podobně snížená schopnost fagocytózy *B. afzelii* vlivem klíštěcích slin či SGE byla pozorována u myších makrofágů (Kýčková a Kopecký, 2006), kde po hodinové inkubaci pozorovali snížení počtu fagocytujících makrofágů o 53% (SGE 2μg/ml) a 57% (SGE 20μg/ml). Ribeiro et al. (1990) pozorovali inhibiční efekt slin *Ixodes dammini* (= *I. scapularis*) na fagocytózu *B. burgdorferi* u krysích neutrofilů. Snížená schopnost fagocytovat by mohla být způsobena obsazením receptorů dendritických buněk proteiny slin. Například Salp15 se váže na lektinový receptor DC-SIGN (Hovius et. al., 2008). Protože DC jsou jedněmi z prvních buněk účastnících se imunitní odpovědi proti boreliím, inhibice jejich fagocytární aktivity může mít velký vliv na šíření infekce a může být jednou z příčin slinami aktivovaného přenosu.

Dendritické buňky po stimulaci boreliemi aktivují specifické CD4⁺ T-lymfocyty. Způsobují jak jejich proliferaci – počet specifických T-lymfocytů po třídní inkubaci s DC stimulovanými boreliemi byl o 36% vyšší než počet T-lymfocytů nespecifických. Vlivem slin byla schopnost DC aktivovat proliferaci specifických T-lymfocytů snížena o 16% a o 29% v případě preinkubace DC se slinami 4 hodiny před přidáním borelií. Také produkce IL2 specifickými T-lymfocyty, kterou vyvolala inkubace s DC stimulovanými boreliemi, byla snížena přidáním klíštěcích slin k DC při inkubaci s boreliemi nebo 4 hodiny před přidáním borelií a to o 5% resp. 22%. Je známo, že proteiny slinných žláz, obzvláště Salp15, mohou přímo inhibovat aktivaci T-lymfocytů přes interakci s CD4 receptorem (Anguita et al., 2002; Garg et al., 2006). Také z kostní dřeně odvozené DC, které byly předem ovlivněné slinami nebo jejich složkami, především prostaglandinem E2, mají zhoršenou schopnost aktivovat antigen specifické T-lymfocyty (Sa-Nunes, 2007). V souladu s těmito daty naše výsledky ukazují, že snížená proliferace T-lymfocytů a produkce cytokinů je zprostředkována dendritickými buňkami. Protože T-lymfocyty nebyly v přímém kontaktu se slinami, pouze s DC, které byly slinami ovlivněné. Je tedy pravděpodobné, že inhibiční efekt slin na T-lymfocyty je jak přímý, tak zprostředkovaný antigen prezentujícími buňkami.

Borelie stimulovaly dendritické buňky k produkci cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-10 a vlivem slin bylo množství všech těchto cytokinů sníženo. Opět byla větší inhibiční schopnost slin pozorována u DC preinkubovaných se slinami 4 hodiny před přidáním borelií. Snížení produkce TNF- α a IL-6 bylo již pozorováno u dendritických buněk pod vlivem proteinu Salp15. Dendritické buňky přijímají signál o boreliové infekci prostřednictvím Toll-like receptorů a lektinů jako je DC-SIGN, na ten se může vázat protein slin Salp15 a inhibovat tak produkci IL-6 a TNF- α zvýšeným rozkladem jejich mRNA (Hovius et al., 2008). Snížená schopnost DC produkovat TNF- α může být také způsobena prostaglandinem E2 přítomným ve slinách (Sa-Nunes et al., 2007). Bylo již dříve ukázáno, že klíštěcí sliny nebo SGE snižují produkci Th1 cytokinů a zvyšují nebo nemění produkci Th2 cytokinů (Kopecký et al., 1999; Skallová et al., 2008; Ferreira a Silva 1999). V této práci se ukazuje, že klíštěcí sliny snižují množství produkovaných Th1 cytokinů (IL-6 a TNF- α), ale překvapivě i jednoho Th2 cytokinu (IL-10). Především po dvoudenní inkubaci DC a borelií se slinami je tento efekt výrazný. Tato data jsou v kontrastu s výsledky publikovanými Kopeckým a kol. (1999), kde byl naopak pozorován významný stimulační efekt slin na produkci IL-10 splenocyty, což podporuje teorii, že sliny nepůsobí jen proti vývoji Th1 imunitní odpovědi, která by vedla k poškození klíštěte, případně i k jeho smrti, ale zároveň podporují Th2 reakci, která na klíště vliv nemá. I další publikace uvádí zvýšení IL-10 vlivem působení slin či SGE. Zeidner a kol.

(1997) při pokusech in vivo rovněž zaznamenali při sání klíštěte na myši kmene C3H/HeJ nárůst hladiny Th2 cytokinů (IL-4 a IL-10) především během prvních několika dní. Jiná studie, která chtěla více prozkoumat efekt slin na IL-10 (Hannier et al., 2003) ukázala, že splenocyty stimulované LPS i Concanavalinem A snížily produkci IL-10 při působení slin a to jak u splenocytů z myší kmene Balb/c tak z kmene C3H/HeN. Tyto kontrastní výsledky vysvětlovali různým původem klíšťat, z nichž byly sliny nebo SGE získány.

Sliny *I. ricinus* tedy ovlivňují schopnost myších dendritických buněk reagovat na infekci *B. afzelii* na všech sledovaných úrovních. Výrazně snižují jejich schopnost fagocytózy, snižují produkci Th1 (IL-6, TNF- α) a překvapivě i Th2 (IL-10) cytokinů. Snižují také schopnost dendritických buněk aktivovat proliferaci T-lymfocytů a produkci IL-2. Byl tedy ukázán inhibiční efekt klíštěcích slin na imunitní odpověď, avšak spíše než posunutí imunitní odpovědi k Th2 jsme pozorovali celkový útlum imunitní reakce. Tento komplexní efekt klíštěcích slin na DC vede jak k omezení nespecifické imunity a zánětlivé reakce tak k vývoji adaptivní imunitní odpovědi a je nepochybně využíván jak klíšťaty, tak jimi přenášenými patogeny.

6. LITERATURA

- ALBERT M.L., PEARCE S. F., FRANCISCO L. M., SAUTER B., ROY P., SILVERSTEIN R. L., AND BHARDWAJ N. 1998: Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α_5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359–1368.
- ALEXEEV A.N., CHUNIKHIN S.P. 1990: The exchange of the tick-borne encephalitis virus between ixodid tick feeding jointly on animals with a subthreshold level of viremia. *Med. Parazitol.* 2:48-50.
- ALITALO A., MERI T., RÄMÖ L., JOKIRANTA T.S., HEIKKILÄ T., SEPPÄLÄ I.J.T., OKSI J., VILJANEN M., MERI S. 2001: Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation, *Infect. Immun.* 69: 3685–3691.
- ALITALO A., MERI T., LANKINEN H., SEPPÄLÄ I., LAHDENNE P., HEFTY P.S., AKINS D., MERI S. 2002: Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralys. *J. Immunol.* 169: 3847–3853.
- ANGUITA J., VENETTA T., SWAPNA S., PERSINSKI R., HERNANZ C., BARTHOLD S.W., FIKRIG E. 2001: *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation facilitates spirochete adaptation and variable major protein-like sequence locus recombination. *J. Immunol.* 167: 3383–3390.
- ANGUITA J., RAMAMOORTHY N., HOVIUS J.W., DAS S., THOMAS V., PERSINSKY R., CONZE D., ASKENASE P.W., RINCON M., KANTOR F.S., FIKRIG E. 2002: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity.* 16:849–859.
- AUWAERTER P.G., AUCOTT J., DUMLER J.S. 2004: Lyme borreliosis (Lyme disease): molecular and cellular pathobiology and prospects for prevention, diagnosis and treatment. *Expert. Rev. Mol. Med.* 6: 1–22.
- BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. 1998: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252.
- BARANTON G., DE MARTINO S.J. 2009: *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr. Probl. Dermatol.* 37:1-17.
- BARBOUR A.G., HAYES S.F. 1986 Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50:381-400.
- BATTISTI J.M., BONO J.L., ROSA P.A., SCHRUMPF M.E., SCHWAN T.G., POLICASTRO P.F. 2008: Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. *Infect. Immun.* 76:5228-37.
- BROWN E.L., WOOTEN R.M., JOHNSON B.J.B., IOZZO R.W., SMITH A., DOLAN M.C., GUO B.P., WEIS J.J., HÖÖK M. 2001: Resistance to Lyme disease in dEcoRIndeficient mice. *J. Clin. Invest.* 107: 845–852
- BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F., BENACH J.L., GRUNWALDT E., DAVIS J.P. 1982: Lyme disease — a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319
- CAVASSANI K.A., ALIBERTI J.C., DIAS A.R.V., SILVA J.S., FERRARA B.R. 2005: Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 114: 235–245.

- CELLA M., SCHEIDEGGER D., PALMER-LEHMANN K., LANE P., LANZAVECCHIA A., ALBER G. 1996: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184: 747-52
- CELLA M., ENGERING A., PINET V., PIETERS J., LANZAVECCHIA A. 1997: Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells see comments. *Nature.* 388: 782-7
- CHRISTE M., RUTTI B., BROSSARD M. 1998: Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of *Ixodes ricinus* after modulation of IgE production with anti-interleukin-4 or anti-interferon-gamma monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* 84: 388-393.
- DANDACHE P., NADELMAN R.B. 2008: Erythema migrans. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22: 235–60.
- DANIELOVÁ V., RUDENKO N., DANIEL M., HOLUBOVÁ J., MATERNA J., GOLOVCHENKO M. AND SCHWARZOVÁ L. 2006: Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic *Int. J. Med. Micro.* 48-53
- DEFOSSE D.L., JOHNSON R.C. 1992: *In vitro* and *in vivo* induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60: 1109-1113.
- DÉRUAZ M., FRAUENSCHUH A., ALESSANDRI A.L., DIAS J.M., COELHO F.M., RUSSO R.C., FERREIRA B.R., GRAHAM G.J., SHAW J.P., WELLS T.N., TEIXEIRA M.M., POWER C.A., PROUDFOOT A.E. 2008: Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* 205:2019-2031.
- EKERFELT C., ERNERUDH J., BUNIKIS J., VRETHEM M., AAGESEN J., ROBERG M., BERGSTROM S., FORSBERG P. 1997: Compartmentalization of antigen specific cytokine responses to the central nervous system in CNS borreliosis: secretion of IFN-gamma predominates over IL-4 secretion in response to outer surface proteins of Lyme disease *Borrelia* spirochetes. *J. Neuroimmunol.* 79: 155–162.
- FAHRER H., SAUVAIN M.J., ZHIOUA E., VAN HOECKE C., GERN L.E. 1998: Longterm survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: what happens to the seropositive individuals? *Eur. J. Epidemiol.* 14: 117–123.
- FERREIRA B.R., SILVA J.S. 1998: Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 279-293.
- FERREIRA B.R., SILVA J.S. 1999: Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* 96: 434-439.
- FIKRIG E., FENG W., BARTHOLD S.W., TELFORD S.R., FLAVELL R.A. 2000: Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *J. Immunol.* 164: 5344–5351.
- FILGUEIRA L., NESTLE F. O., RITTIG M., JOLER H. I., GROSCURTH P. 1996: Human Dendritic Cells Phagocytose and Process *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 157: 2998–3005.
- FRANCISCHETTI I.M., VALENZUELA J.G., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., RIBEIRO J.M. 2002: Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood.* 99: 3602-3612.

- GALY A., GEORGOPOULOS K., WU L. 1999: Dendritic Cells, Hematopoietic Cell Fate and Development of Dendritic Cells. *Academic Press*. 3–14.
- GARG R., JUNCADELLA I.J., RAMAMOORTHY N., ASHISH, ANANTHANARAYANAN S.K., THOMAS V., RINCÓN M., KRUEGER J.K., FIKRIG E., YENGO C.M., ANGUITA J. 2006: Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol*. 177:6579–6583.
- GEIJTENBEEK T.B., KWON D.S., TORENSMA R., VAN VLIET S.J., VAN DUIJNHOFEN G.C., MIDDEL J., CORNELISSEN I.L., NOTTET H.S., KEWALRAMANI V.N., LITTMAN D.R., FIGDOR C.G., VAN KOOYK Y. 2000: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 100 587–597.
- GERN L., RAIS O. 1996: Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* tick (Acari: Ixodidae). *J.Med. Entomol*. 33:189-192.
- GILLESPIE R.D., DOLAN M.C., PIESMAN J., TITUS R.G. 2001: Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol*. 166: 4319-4326.
- GRAY J. 1999: Risk assessment in Lyme borreliosis. *Wien Klin. Wochenschr*. 111:990-993.
- GUO B.P., NORRIS S.J., ROSENBERG L.C., HOOK M. 1995: Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infect. Immun*. 63: 3467–3472.
- HABICHT G.S., BECK G., BENACH J.L., COLEMAN J.L., LEICHTLING K.D. 1985 Lyme disease spirochetes induce human and murine interleukin 1 production. *J Immunol*. 134: 3147-3154.
- HANNIER S., LIVERSIDGE J., STERNBERG J.M., BOWMAN A.S. 2003: *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B-lymphocytes. *Parasite Immunol*. 25:27-37.
- HELLWAGE J., MERI T., HEIKKILÄ T., ALITALO A., PANELIUS J., LAHDENNE P., SEPPÄLÄ I.J.T., MERI S. 2001: The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem*. 276: 8427–8435.
- HIRSCHFELD M., KIRSCHNING C.J., SCHWANDNER R., WESCHE H., WEIS J.H., WOOTEN R.M., WEIS J.J. 1999: Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol*. 163:2382–6.
- HORKÁ H., ČERNÁ-KÝČKOVÁ K., SKALLOVÁ A., KOPECKÝ J. 2009: Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int. J. Med. Microbiol*. 299:373-380.
- HOVIUS J.W.R., VAN DAM A.P., FIKRIG E. 2007: Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis, *Trends Parasitol*. 23: 434-438.
- HOVIUS J.W.R., SCHUIJT T.J., DE GROOT K.A., ROELOFS J.J., OEI G.A., MARQUART J.A., DE BEER R., VAN 'T VEER C., VAN DER POLL T., RAMAMOORTHY N., FIKRIG E., VAN DAM A.P. 2008: Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis*. 198:1189-97.
- HOVIUS J.W.R., DE JONG M.A.W.P, DEN DUNNEN J., LITJENS M., FIKRIG E., VAN DER POLL T., GRINGHUIS S.I., GEIJTENBEEK T.B.H. 2008: Salp15 Binding to DC-SIGN Inhibits Cytokine Expression by Impairing both Nucleosome Remodeling and mRNA Stabilization. *PLoS Pathogens*. 4:31.

- JOHNSON R. C. 1977: The spirochetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 89-106.
- JONES L.D., DAVIES C.R., STEELE G.M., NUTTALL P.A. 1987: A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science.* 237:775-777.
- JUNCADELLA I.J., GARG R., ANANTHARAYANAN S.K., YENGO C.M., ANGUITA J. 2007: T cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49:433-438.
- KARCZEWSKI J., ENDRIS R., CONNOLLY T.M. 1994: Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 269: 6702-6708.
- KOPECKÝ J., KUTHEJLOVÁ M., PECHOVÁ J., LIN J.X. 1999: Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite. Immunol.* 21:351-356.
- KRAICZY P., SKERKA C., KIRSCHFINK M., BRADE V., ZIPFEL P.F. 2001: Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H, *Eur. J. Immunol.* 31: 1674-1684.
- KROČOVÁ Z., MACELA A., HERNYCHOVÁ L., KROČA M., PECHOVÁ J., KOPECKÝ J. 2003: Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J. Parasitol.* 89:14-20.
- KUBEŠ M., FUCHSBERGER N., LABUDA M., ZUFFOVA E., NUTTALL P.A. 1994: Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology.* 82: 113-116.
- KURTENBACH K., Sewell H.S., Ogden N.H., Randolph S.E., Nuttall P.A. 1998: Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* 66: 1248-1251.
- KUTHEJLOVÁ M., KOPECKÝ J., ŠTĚPÁNOVÁ G., MACELA A. 2001: Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 69: 575-578.
- KÝČKOVÁ K., KOPECKÝ J. 2006: Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*, *J. Med. Entomol.* 43: 1208-1214.
- LABUDA, M., JONES, L.D., WILLIAMS, T., NUTTALL, P.A. 1993: Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.* 7:193-196.
- LUSITANI D., MALAWISTA S.E., MONTGOMERY R.R. 2002: *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J. Infect. Dis.* 185: 179-184.
- MACHÁČKOVÁ M., KOPECKÝ J., OBORNÍK, M. 2006: Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto in vivo*. *Folia Parasitol.* 53:153-158.
- MAHNKE K., GUO M., LEE S., SEPULVEDA H., SWAIN S.L., NUSSENZWEIG M., STEINMAN R.M. 2000: The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell. Biol.* 151: 673-684.

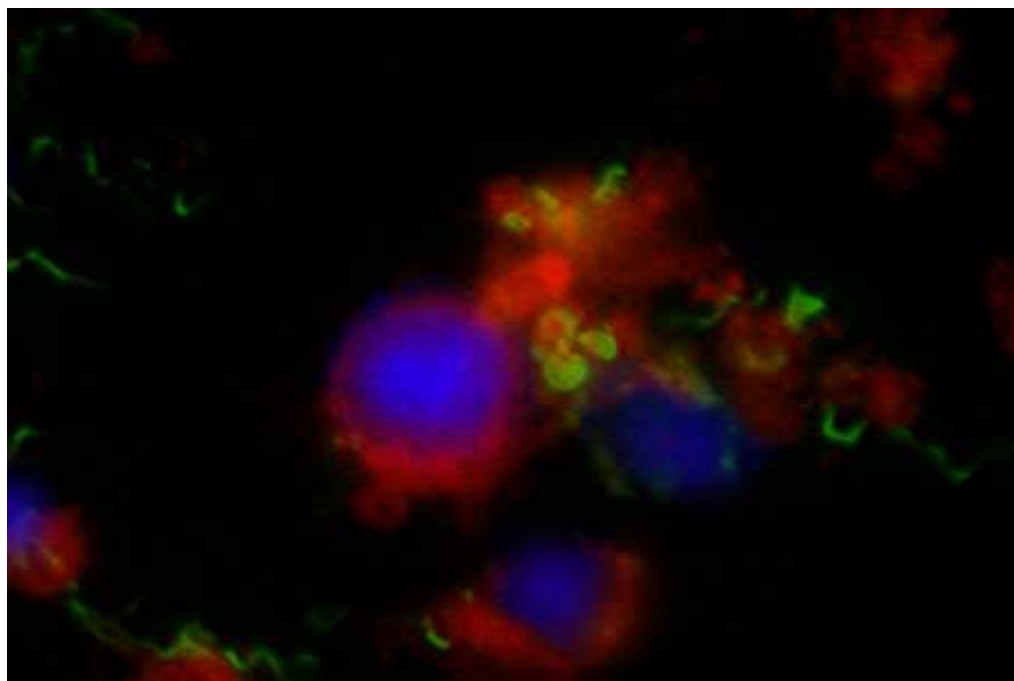
- MODOLLEL M., SCHAIBLE U.E., RITTIG M., SIMON M.M. 1994: Killing of *Borrelia burgdorferi* by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete. *Immunology Letters*. 40: 139-146.
- MONTGOMERY R.R., LUSITANI D., DE BOISFLEURY CHEVANCE A., MALAWISTA S.E. 2002: Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi* *J. Infect. Dis.* 185: 1773-1776.
- MOSMANN T.R., COFFMAN R.L. 1989: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.
- NAJMAN H.W., KLEIJMEER M.J., OSSEVOORT M.A., OORSCHOT W.A., VIERBOOM M.P., VAN DE KEUR M., KENEMANS P., KAST W.M., GEUZE H.J., MELIEF C.J. 1995: Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182: 163-74.
- NARASIMHAN S., KOSKI R.A., BEAULIEU B., ANDERSON J.F., RAMAMOORTHY N., KANTOR F., CAPPELLO M., FIKRIG E. 2002: A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect. Mol. Biol.* 11: 641-650.
- NARASIMHAN S., CAMAINO M.J., LIANG F.T., SANTIAGO F., LASKOWSKI M., PHILIPP M.T., PACHNER A.R., RADOLF J.D., FIKRIG E. 2003: *Borrelia burgdorferi* transcriptome in the central nervous system of non-human primates. *PNAS* 100: 15953–15958.
- NEELEMAN C., GEELLEN S.P.M., AERTS P.C., DAHA M.R., MOLLNES T.E., ROORD J.J., POSTHUMA G., VAN DIJK H., FLEER A. 1999: Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect. Immun.* 67: 4517–4524.
- NETEA M.G., VAN DER MEER J.W., KULLBERG B.J. 2004: Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol.* 12: 484–488.
- OGDEN N.H., BARKER I.K., BEAUCHAMP G., BRAZEAU S., CHARRON D.F., MAAROUF A., MORSHED M.G., O'CALLAGHAN C.J., THOMPSON R.A., WALTNER-TOEWS D., WALTNER-TOEWS M., LINDSAY L.R. 2006: Investigation of ground level and remote-sensed data for habitat classification and prediction of survival of *Ixodes scapularis* in habitats of southeastern Canada. *J. Med. Entomol.* 43: 403–414.
- ORNSTEIN K., BERGLUND J., NILSSON I., NORRBY R., BERGSTRÖM S. 2001: Characterization of Lyme Borreliosis Isolates from Patients with Erythema Migrans and Neuroborreliosis in Southern Sweden *Journal of Clinical Microbiology.* 39:1294-1298
- PAESEN G.C., ADAMS P.L., HARLOS K., NUTTALL P.A., STUART D.I. 1999: Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell.* 3: 661-671.
- PAINE S.H., KEMP D.H., ALLEN J.R. 1983: *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology.* 86: 419-428.
- PATRICAN L.A. 1997: Acquisition of Lyme disease spirochetes by cofeeding *Ixodes scapularis* ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:589-593.
- PECHOVÁ J., ŠTĚPÁNKOVÁ G., KOVÁŘ L., KOPECKÝ J. 2002: Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol.* 49:153–159.

- PEGUET-NAVARRO J., DALBIEZ-GAUTHIER C., RATTIS F.M., VAN KOOTEN C., BANCHEREAU J., SCHMITT D. 1995: Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol.* 155: 4241-7.
- PIERRE P., TURLEY S.J., GATTI E., HULL M., MELTZER J., MIRZA A., INABA K., STEINMAN R.M., MELLMAN I. 1997: Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature.* 388: 787-92.
- PROBERT W.S., JOHNSON, B.J. 1998: Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol. Microbiol.* 30: 1003–1015.
- PUIUS Y.A., KALISH R.A. 2008: Lyme arthritis: pathogenesis, clinical presentation, and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22: 289–300.
- RADOLF J.D. , NORGARD M.V., BRANDT M.E., ISAACS R.D., THOMPSON P.A., BEUTLER B. 1991: Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. Analysis using a CAT reporter construct. *J. Immunol.* 147: 1968-1974
- RAM S., MACKINNONB F.G., GULATIA S., MCQUILLENA D.P., VOGELC U., FROSCHC M., ELKINSD C., GUTTORMSENE H.K., WETZLER L.M., OPPERMANNF M., PANGBURNG M.K., RICEA P.A. 1999: The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*, *Mol. Immunol.* 36: 915–928.
- RAMACHANDRA R.N., WIKEL S.K. 1992: Modulation of host-immune responses to ticks (Acari: Ixodidae): efekt of solivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* 29: 818-826.
- RAMACHANDRA R.N., WIKEL S.K. 1995: Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) solivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: *in vitro* cytosine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *J. Med. Entomol.* 32: 338-345.
- RAMAMOOTHRY N., NARASIMHAN S., PAL U., BAO F., YANG X.F. 2005: The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature.* 436: 573-577.
- RIBEIRO J.M., WEIS J.J., TELFORD S.R. 1990: Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70: 382-388.
- RICHTER D., ALLGOWER T., MATUSCHKA F.R. 2002: Cofeeding transimition and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1421-1425.
- RITTIG M.G., KRAUSE A., HAUPL T., SCHAIBLE U.E., MODOLELL M., KRAMER M.D., LUTJEN-DRECOLL E., SIMON M.M., BURMESTER G.R. 1992: Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60: 4205-4212.
- SA-NUNES A., BAFICA, A., LUCAS D.A., CONRADS T.P., VEENSTRA T.D., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., RIBEIRO J.M., FRANCISCETTI. 2007: Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J. Immunol.* 179:1497-1505.
- SALLUSTO F. AND LANZAVECCHIA A. 1994: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118.
- SATO Y., NAKAO M. 1997: Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *J. Parasitol.* 83: 547-550.

- SCHWAN T.G., PIESMAN J., GOLDE W.T., DOLAN M.C., ROSA P.A. 1995: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:2909-2913.
- SKALLOVÁ A., IEZZI G., AMPENBERGER F., KOPF M., KOPECKÝ J. 2008: Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol.* 180: 6186-6192
- SRIVASTAVA S.Y., DE SILVA A.M. 2008: Reciprocal expression of ospA and ospC in single cells of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 190:3429-33.
- STEERE A.C., MALAWISTA S.E., SNYDMAN D.R., SHOPE R.E., ANDIMAN W.A., ROSS M.R., STEELE F.M. 1977: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20: 7-17.
- STEERE A.C., SIKAND V.K., SCHOEN R.T., NOWAKOWSKI J. 2003: Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*". *Clin. Infect. Dis.* 37: 528-532.
- STEERE A.C., COBURN J., GILCKSTELN L. 2004: The emergence of Lyme disease. *J.Clin. Invest.* 113: 1093-1101.
- STEINMAN, R.M. 1991: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.
- STEVENSON B., EL-HAGE N., HINES M.A., MILLER J.C., BABB K. 2002: Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 70: 491-497.
- SUHONEN J., KOMI J., SOUKKA J., LASSILA O., VILJANEN M.K. 2003: Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells. *Scand. J.Immunol.* 58: 67-75.
- SUK K., DAS S., SUN W., JWANG B., BARTHOLD S.W., FLAVELL R.A., FIKRIG E. 1995: *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in the infected host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 4269-4273.
- ŠTĚPÁNOVÁ-TRESOVÁ G., KOPECKÝ J., KUTHEJLOVÁ M. 1990: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* tick from southern Bohemia using monoclonal antibodies. *Zbl.Bakteriol.* 289:797-806.
- TITUS R.G., RIBEIRO J.M. 1998: Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* 239: 1306-1308.
- UNDERHILL D.M., OZINSKY A., HAJJAR A.M., STEVENS A., WILSON C.B., BASSETTI M., ADEREM A. 1999: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.
- URIESTE S., HALL L.R., TELFORD S.R., TITUS R.G. 1994: Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 180: 1077-1085.
- WALKER A.R. 2001: Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull. Entomol. Res.* 91: 69-78.

- WANG H., NUTTALL P.A. 1994: Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*. 109: 525-530. Erratum in: *Parasitology* 1995.110:363.
- WIKEL S.K. 1982: Influence of *Dermacentor andersoni* infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76: 627-632.
- WIKEL S.K. 1996: Host immunity to ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 1-22.
- WIKEL S.K., RAMACHANDRA R.N., BERGMAN D.K. 1996: Arthropod modulation of host immune responses. In: Wikel SK, editor. The immunology of host-actoparasitic arthropod relationships. *Wallingford: CAB International*. 107-130.
- WILSKE B., FINGERLE V., PREAC-MURSIC V., JAURIS-HEIPKE S., HOFMANN A., LOY H., PFISTER H.W., ROSSLER D., SOUTSCHEK E. 1994: Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Med. Microbiol. Immunol.* 183: 43-59.
- WILSKE B., FINGERLE V., SCHULTE-SPECHTEL U. 2007: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49:13-21.
- WINZLER C., ROVERE P., RESCIGNO M., GRANUCCI F., PENNA G., ADORINI L., ZIMMERMANN V.S., DAVOUST J., RICCIARDI-CASTAGNOLI P. 1997: Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185: 317-28.
- YSSEL H., SHANAFELT M. C., SODERBERG C., SCHNEIDER P. V., ANZOLA J., PELTZ G. 1991: *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like T cell subset in Lyme arthritis. *J. Exp. Med.* 174: 593-601.
- ZEIDNER N.S., MBOW M.L., DOLAN M., MASSUNG R., BACA E, PIESMAN J. 1997: Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a Th2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* 65:3100-3106
- ZEIDNER N.S., SCHNEIDER B.S., NUNCIO M.S., GERN L., PIESMAN J. 2002: Co-inoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochaete load in mice and is tick species-specific. *J.Parasitol.* 88: 1276-1278.
- ZHANG J.R., HARDHAM J.M., BARBOUR A.G., NORRIS S.J. 1997: Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell.* 89:275-285.

PŘÍLOHA



Ukázka coiling fagocytózy borelie dendritickou buňkou.