

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Interakce buněk přirozené imunity se spirochetami
lymeské boreliózy a jejich ovlivnění molekulami klíčtějších
slin**

Diplomová práce

Bc. Jana Páleníková

Školitelka: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

České Budějovice 2012

Páleníková J., 2012: Interakce buněk přirozené imunity se spirochetami lymeské boreliózy a jejich ovlivnění molekulami klíštěcích slin. [Interactions of innate immunity cells with Lyme disease spirochetes and the effect of tick saliva molecules on these interactions. Mgr. Thesis, in Czech.] – 66 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Aim of this study was to examine the effect of selected tick saliva molecules on interactions between mouse innate immunity cells and Lyme disease spirochetes *Borrelia burgdorferi*. We determined the effect of two serine protease inhibitors on the production of cytokines by dendritic cells and how the proteins influence the phagocytosis ability of macrophages.

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Jana Páleníková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem lidem, kteří se různým způsobem spolupodíleli na vytvoření mé diplomové práce. Na prvním místě bych chtěla vyjádřit velký dík své báječné školitelce Helče Langhansové, které si velmi vážím za její skvělé vedení, cenné rady a psychickou podporu v těžkých chvílích. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře Imunologie parazitóz. Jmenovitě Jarce Lieskovské za pomoc při práci s dendritickými buňkami, za podnětné rady a podporu, Evě Výletové za pomoc s buněčnými liniemi a Verči Slavíkové za pěstování borelií. Velký dík patří také panu profesorovi Janu Kopeckému, za výběr tématu mé diplomové práce a za umožnění práce v laboratoři Imunologie parazitóz. Nakonec bych chtěla poděkovat také všem členům mé rodiny za jejich podporu při mém studiu.

OBSAH

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 1 -
1.1. LYMESKÁ BORELIÓZA	- 1 -
1.2. ROD BORRELIA	- 3 -
1.2.1. TAXONOMIE.....	- 3 -
1.2.2. MORFOLOGIE.....	- 5 -
1.2.3. GENOM	- 6 -
1.3. INTERAKCE BORELIÍ S IMUNITNÍM SYSTÉMEM HOSTITELE	- 7 -
1.4. KLÍŠTĚ.....	- 9 -
1.4.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	- 9 -
1.4.2. ŽIVOTNÍ CYKLUS.....	- 10 -
1.5. INTERAKCE KLÍŠTĚTE S IMUNITNÍM SYSTÉMEM HOSTITELE	- 11 -
1.5.1. ÚČINEK SLIN NA HOSTITELSKÝ IMUNITNÍ SYSTÉM	- 12 -
1.5.1.1. Molekuly s antihemostatickými vlastnostmi.....	- 12 -
1.5.1.2. Molekuly s imunomodulačními vlastnostmi	- 13 -
1.6. VZÁJEMNÝ VZTAH KLÍŠTĚ – BORELIE	- 15 -
1.7. BUŇKY PŘIROZENÉ IMUNITY.....	- 16 -
1.7.1. DENDRITICKÉ BUŇKY	- 16 -
1.7.1.1. Úloha dendritických buněk v imunitní odpovědi.....	- 16 -
1.7.1.2. Účinek slin na dendritické buňky.....	- 18 -
1.7.2. MAKROFÁGY	- 19 -
1.7.2.1. Úloha makrofágů v imunitní odpovědi	- 19 -
1.7.2.2. Účinek slin na makrofágy	- 20 -
1.8. PROTEINY SLINNÝCH ŽLÁZ – SERPINY	- 21 -
1.8.1. IRS-2	- 21 -
2. CÍLE PRÁCE	- 23 -
3. MATERIÁL A METODY	- 24 -
3.1. MATERIÁL.....	- 24 -
3.1.1. MYŠI.....	- 24 -
3.1.2. BUNĚČNÁ LINIE	- 24 -
3.1.3. BORELIE.....	- 24 -
3.1.4. PHRODO™ BIOPARTICLES® CONJUGATES	- 25 -
3.1.5. REKOMBINANTNÍ PROTEINY	- 25 -
3.2. METODY.....	- 25 -
3.2.1. OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI.....	- 25 -
3.2.1.1. Design pokusu	- 25 -
3.2.1.2. Izolace dendritických buněk pomocí magnetické separace	- 26 -
3.2.1.3. Aktivace dendritických buněk	- 26 -
3.2.1.4. Cytokinová ELISA	- 27 -
3.2.2. STANOVENÍ ÚROVNĚ OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINU DENDRITICKÝMI BUŇKAMI.....	- 28 -
3.2.2.1. Design pokusu	- 28 -
3.2.2.2. Izolace RNA z aktivovaných dendritických buněk.....	- 28 -
3.2.2.3. Reverzní transkripce	- 28 -
3.2.2.4. Reverse-transcription PCR.....	- 28 -
3.2.3. OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY MAKROFÁGŮ	- 29 -
3.2.3.1. Design pokusu	- 29 -

3.2.3.2.	Příprava buněk	- 29 -
3.2.3.3.	Příprava borelií značených CFSE a pHrodo kuliček.....	- 29 -
3.2.3.4.	Fagocytóza CFSE borelií a pHrodo kuliček.....	- 30 -
3.2.3.5.	Měření fagocytózy	- 30 -
3.2.4.	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	- 31 -
4.	VÝSLEDKY	- 32 -
4.1.	OVlivnění produkce cytokinů dendritickými buňkami	- 32 -
4.2.	STANOVENÍ ÚROVNĚ OVlivnění produkce cytokinu dendritickými buňkami.....	- 40 -
4.3.	OVlivnění fagocytózy makrofágů	- 41 -
5.	DISKUSE	- 45 -
5.1.	OVlivnění produkce cytokinů dendritickými buňkami	- 45 -
5.2.	OVlivnění fagocytózy makrofágů	- 47 -
5.2.1.	OPTIMALIZACE METODY	- 47 -
5.2.2.	OVlivnění fagocytózy makrofágů	- 50 -
6.	ZÁVĚR	- 52 -
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	- 53 -
8.	CITOVANÁ LITERATURA.....	- 55 -

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. LYMESKÁ BORELIÓZA

Lymeská borelióza patří v současnosti mezi nejrozšířenější klíšťaty přenášené onemocnění v USA a Evropě (Dennis a Hayes 2002).

Historie tohoto onemocnění sahá do roku 1883, kdy byly poprvé popsány příznaky onemocnění, dnes známé jako acrodermatitis chronica artrophicans. Během následujících let byly pozorovány a popsány další příznaky, které dnes připisujeme lymeské borelióze (Bartůněk et al. 2006). Milníkem v historii lymeské boreliózy je však rok 1976, kdy byl v městečku Old Lyme ve státě Connecticut zaznamenán epidemický výskyt revmatoidní artritidy u dětí. Poté co bylo toto onemocnění dáno do souvislosti s dalšími příznaky a vysokým výskytem klíšťat *Ixodes scapularis* v dané oblasti, bylo zřejmé, že revmatoidní artritida je pozdním projevem klíšťaty přenášeného onemocnění, nazvaného lymeská borelióza. V roce 1981 pak Burgdorfer izoloval z nymf *Ixodes scapularis* novou spirochetu nazvanou *Borrelia burgdorferi*. O rok později byla tato spirocheta kultivována také z pacientů trpících lymeskou boreliózou, čímž byla oficiálně potvrzena jako etiologické agens tohoto onemocnění (Steere 1989).

Lymeskou boreliózu u lidí prokazatelně způsobují čtyři z dnes známých osmnácti druhů spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l.*), a to *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*B.b.s.s.*), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia spielmanii* (Wilske et al. 2007).

Borelióza je komplexní onemocnění postihující řadu orgánů. Pacient je obvykle infikován spirochetami, které proniknou do kůže při sání klíštěte a odtud se šíří dále do organismu. Rozlišujeme tři fáze infekce boreliemi. V první fázi ranné lokalizované infekce pozorujeme typickou skvrnu s projasněním ve středu, která je nazývána erythema migrans. Ta se objevuje týden či dva po infekci a lze ji nalézt u více jak 80 % pacientů. První fáze může být též doprovázena sérií chřipkových příznaků, jako jsou zvýšená teplota, nevolnost či bolesti kloubů (Nau et al. 2009).

Několik týdnů po první fázi infekce následuje druhá fáze časné generalizované infekce, kdy dochází k rozptýlení spirochet z kůže do sekundárních orgánů. Nejčastějším projevem je postižení nervové soustavy – neuroborelióza, projevující se meningitidou, obrnou lícního nervu či myelitidou (Satz 2002). Postižení může dále zahrnovat srdce, klouby či oči (Duray a Steere 1988, Bartůněk et al. 2006).

Měsíce až roky po infekci se manifestuje třetí fáze onemocnění, nazývaná také pozdní či chronická. Typicky se projevuje jako acrodermatitis chronica atrophicans (Satz 2002) či chronická artritida postihující především kolenní a ramenní klouby. Tato artritida často přetrvává i po přeléčení antibiotiky, zřejmě jako důsledek zkřížené autoimunitní reakce (Steere a Glickstein 2004).

Klinické projevy infekce závisí kromě věku a zdravotního stavu pacienta také na druhu borelií, kterými je člověk infikován. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto způsobuje především kloubní onemocnění, *Borrelia afzelii* infikuje kůži a způsobuje její chronické poškození a *Borrelia garinii* je neurotropní (Steere et al. 1987, Oschmann 1999, Brown et al. 2003).

V současné době není dostupná žádná vakcína proti lymeské borelióze. Existuje však již několik kandidátních vakcín, jejichž účinnost a bezpečnost je v současnosti zkoumána. Mezi hlavní boreliové antigeny, které jsou testovány jako potenciální vakcíny, patří OspA (outer surface protein A), OspC (outer surface protein C), DbpA (decorine binding protein A) a další. Kromě boreliových antigenů je vývoj vakcíny proti lymeské borelióze zaměřen na proteiny klíštěcích slin jako je například Salp15 (Schuijt et al. 2010). Vakcíny založené na imunizaci hostitele imunomodulačními proteiny klíštěcích slin se nazývají „trans-block“ vakcíny neboli vakcíny blokuující přenos. Jejich cílem je zablokování přenosu patogena.

Tab. 1. Klinická charakteristika lymeské boreliózy (převzato z Parola a Raoult 2001)

klinická charakteristika podle fáze infekce			
	časná infekce		
symptomy	lokalizovaná	diseminovaná	chronická
kožní	erythema migrans	EM, sekundární léze, lymfocytom, vyrážka, kopřivka	acrodermatitis chronica atrophicans
neurologické	-	meningitida, neuritida, myelitida	encefalomyelitida, demyelinizační syndrom, polyneuropatie
srdeční	-	myokarditida, myoperikarditida	
revmatologické		lehká artritida	chronická artritida
oční		konjunktivitida	keratitida
různé	chřipkové příznaky	hepatitida, splenomegalie, hematurie, proteinurie	-

1.2. ROD *BORRELIA*

1.2.1. TAXONOMIE

Z taxonomického hlediska řadíme borelie do třídy Spirochaetes, řádu Spirochaetales a čeledi Spirochaetaceae. Do této čeledi spolu s rodem *Borrelia* patří mj. další medicínský významný rod *Treponema*, původce syfilidy.

Rod *Borrelia* lze rozdělit na dvě skupiny borelií způsobující různá onemocnění obratlovců včetně člověka. Patří sem druhy způsobující návratnou horečku (např. *Borrelia duttoni*) a komplex druhů souhrnně označovaný *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V současné době tento komplex zahrnuje již 18 druhů. Patří mezi ně *B. afzelii*, *B. americana*, *B. andersoni*, *B. bavariensis*, *B. bisetii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. valaisiana* a *B. yangtze* (Canica et al. 1993, Rudenko et al. 2009a, Marconi et al. 1995, Margos et al. 2009, Postic et al. 1998, Johnson et al. 1984, Postic et al. 2007, Rudenko et al. 2009b, Baranton et al. 1992, Kawabata et al. 1993, Margos et al. 2010, Le Fleche et al. 1997, Masuzawa et al. 2001, Richter et al. 2004, Fukunaga et al. 1996, Wang et al. 1997, Chu et al. 2008).

V Evropě se na rozdíl od Ameriky, kde lze nalézt pouze *B. burgdorferi* s.s., vyskytují všechny čtyři patogenní druhy. Jejich přenašeči jsou klíšťata rodu *Ixodes*. V Evropě je to *Ixodes ricinus*, v Americe *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus*. V Asii pak nalezneme *B. afzelii* a *B. spielmanii* přenášené klíštětem *Ixodes persulcatus* (Miyamoto a Masuzawa 2002). V Asii a Evropě byla též zaznamenána infekce *B. valaisiana*, která způsobuje erythema migrans a často se vyskytuje v koinfekci s *B. garinii* (Bartůněk et al. 2006).

Tab. 2. Přehled jednotlivých druhů borelií

druh	hlavní vektor	lokalizace	citace
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	Asie, Evropa	Canica et al. 1993
<i>Borrelia americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	USA	Rudenko et al. 2009a
<i>Borrelia andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	USA	Marconi et al. 1995
<i>Borrelia bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa	Margos et al. 2009
<i>Borrelia bisetii</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus, I. minor</i>	USA, Evropa	Postic et al. 1998
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	USA, Evropa	Johnson et al. 1984
<i>Borrelia californiensis</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	USA	Postic et al. 2007
<i>Borrelia carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	USA	Rudenko et al. 2009b
<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	Asie, Evropa	Baranton et al. 1992
<i>Borrelia japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Japonsko	Kawabata et al. 1993
<i>Borrelia kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	USA, Evropa	Margos et al. 2010
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa	Le Fleche et al. 1997
<i>Borrelia sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Čína	Masuzawa et al. 2001
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa	Richter et al. 2004
<i>Borrelia tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	Japonsko	Fukunaga et al. 1996
<i>Borrelia turdae</i>	<i>I. turdus</i>	Japonsko	Fukunaga et al. 1996
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>I. ricinus, I. granulatus</i>	Asie, Evropa	Wang et al. 1997
<i>Borrelia yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Čína	Chu et al. 2008

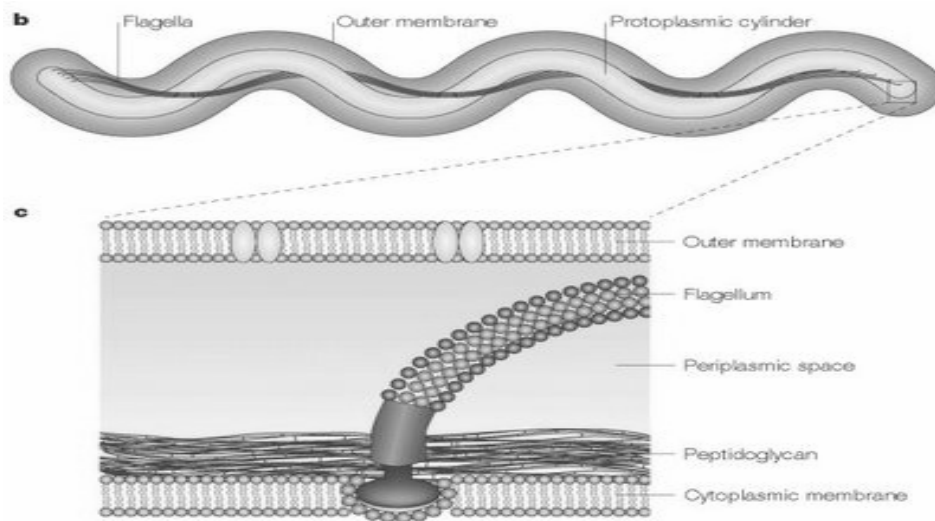
1.2.2. MORFOLOGIE

Borelie jsou mikroareroofilní Gramnegativní spirochety, pro které je typický protáhlý spirálovitý tvar s pravidelnými závity ve vzdálenosti 2,2 μm , jejichž počet kolísá mezi čtyřmi až patnácti (Goldstein et al. 1996). Rovněž délka spirochet může být značně variabilní, v závislosti na jednotlivých druzích se pohybuje mezi 10 a 20 μm . Šířka borelií dosahuje 0,2–0,5 μm (Barbour a Hayes 1986).

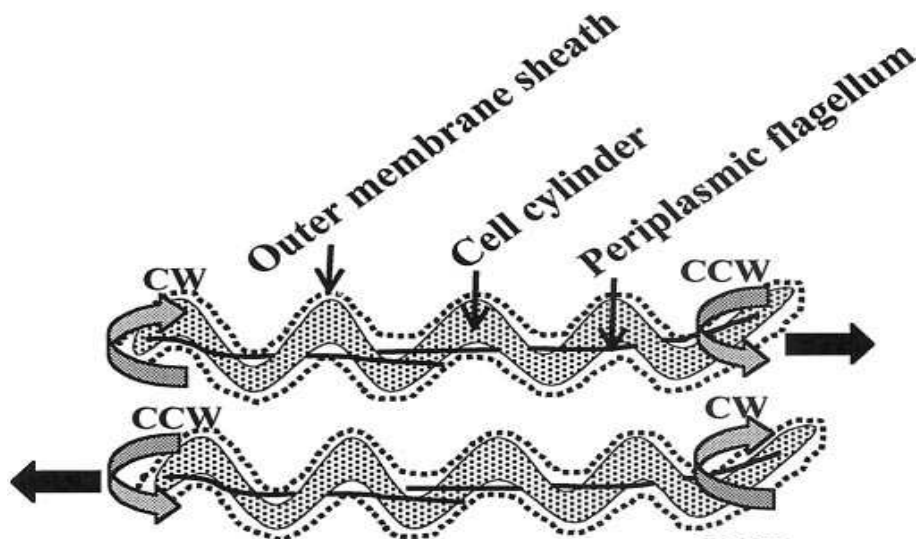
Na svém povrchu mají borelie vnější mnohovrstevnou membránu, která má unikátní strukturu, charakteristickou vyšším zastoupením proteinů kovalentně modifikovaných s lipidy, nižším podílem transmembránových proteinů a absencí bakteriálního lipopolysacharidu, který je typický pro Gramnegativní bakterie (Haake 2000, Hossain et al. 2001). Tato membrána je navíc značně tekutá a labilní. Její unikátní architektura tak zřejmě odpovídá za lepší přežití borelií v přenašeči i hostiteli (Haake 2000).

Vnější membrána obklopuje protoplasmatický cylindr, který se skládá z cytoplasmy a peptidoglykanu (Barbour a Hayes 1986). Tyto dvě vrstvy (vnější membrána a protoplasmatický cylindr) jsou odděleny periplazmatickým prostorem, ve kterém se nachází sedm až jedenáct helikálních bičíků. Bičíky se vypínají z bazálních disků umístěných v cytoplasmatické membráně na obou pólech buňky (Motaleb 2000). Bičíky jsou složeny z flagelárních proteinů dvou tříd. FlaA se nachází v pochvě bičíků a je typický pro spirochety, zatímco FlaB, nazývaný flagellin, se nachází v dřeni (Ge et al. 1998). Proteiny bičíků jsou silně imunogenní, avšak díky lokalizaci bičíků pod vnější membránou jsou tyto antigeny chráněny před imunitním systémem hostitele.

Periplazmatické bičíky borelií obtáčeující celý buněčný cylindr hrají důležitou úlohu nejen při pohybu spirochet, ale také při udržování jejich specifického tvaru. Na rozdíl od většiny bakterií, jejichž tvar je udržován vrstvou peptidoglykanu buněčné stěny, je tvar borelií výsledkem komplexního působení buněčného cylindru a vnitřních bičíků (Motaleb et al. 2000). Pro borelie je typický šroubovitý pohyb, který jim umožňuje pohyb jak v nízce, tak i ve vysoce viskózním prostředí (Wolgemuth et al. 2006).



Obr. 1. Schématický nákres borelie (Rosa et al. 2005)



Obr. 2. Rotační pohyb borelie (Li et al. 2002)

1.2.3. GENOM

Genom borelií je unikátní svou strukturou. Poprvé byla kompletní genomová sekvence *Borrelia burgdorferi* sensu stricto kmene B31 publikována Fraserovou v roce 1997 (Fraser et al. 1997). Genom sestává z lineárního chromozomu o velikosti 910 725 párů bazí (bp) a z dvanácti lineárních a devíti cirkulárních plasmidů o celkové velikosti 610 644 bp (Casjens et al. 2000). Chromozomální genom borelií je relativně malý, obsahuje geny kódující základní proteiny pro replikaci DNA, transkripci, translaci, transport látek a energetický metabolismus. Avšak chybí zde geny pro syntézu nukleových kyselin, aminokyselin, mastných kyselin a kofaktorů enzymů. Kvůli tomuto nedostatku biosyntetických drah je pro růst borelií in vitro nutné speciální růstové medium BSK-H

doplňené králičím sérem (Barbour a Hayes 1986, Tilly et al. 2008). Na plazmidech se nachází především geny pro povrchové proteiny bakterií a faktory virulence. Některé plazmidy se během kultivace ztrácejí, což může vést ke ztrátě infekivity a virulence patogena. Avšak například plazmid cp26 nesoucí gen pro povrchový lipoprotein OspC, nacházející se ve všech přírodních izolátech, se během in vitro kultivace neztrácí (Casjens et al. 2000). Lineární plazmidy obsahují velké množství pseudogenů, které jsou zřejmě důsledkem rychlých evolučních změn (Casjens et al. 2000).

V nedávné době byla provedena genomová sekvence dalších třinácti izolátů. Genetická informace zapsaná na lineárním chromozomu se zdá být značně stabilní a až na pár výjimek je genetický obsah mezi jednotlivými izoláty identický (Schutzer et al. 2011). Avšak mezi plazmidy je značná variabilita jak uvnitř jednotlivých izolátů, tak i mezi nimi. Zdá se, že může dokonce probíhat horizontální výměna genetické informace mezi plasmidy blízké příbuzných kmenů *Borrelia burgdorferi* (Qui et al. 2004, Schutzer et al. 2011). Například geny, které jsou důležité pro infektivitu nebo přetrvání v hostiteli jako jsou *ospC* či *vlsE*, se uvnitř i mezi jednotlivými kmeny významně liší na úrovni nukleotidů a aminokyselin. Tato variabilita v genomovém produktu značně komplikuje vývoj vakcíny založené na těchto proteinech (Tilly et al. 2008).

1.3. INTERAKCE BORELIÍ S IMUNITNÍM SYSTÉMEM HOSTITELE

Během sání klíštěte borelie infikují hostitele a indukují silnou imunitní odpověď, jež zahrnuje mechanismy přirozené i specifické imunity. Navzdory tomu jsou borelie schopny přetrvat v hostiteli několik let, a to i po antibiotické léčbě. Je to díky tomu, že borelie si stejně jako mnoho jiných bakterií vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožňují vyhnout se účinkům imunitního systému či je potlačit. Mezi ně patří například snížená exprese některých povrchových lipoproteinů, inaktivace efektorových mechanismů a skrývání se v imunologicky privilegovaných místech jako je mezibuněčná hmota.

Hlavní roli v obraně proti boreliím hraje především v začáteční fázi infekce přirozená imunita. Antigeny na povrchu borelií aktivují alternativní dráhu komplementu. Složka C3b komplementu se naváže na povrch bakterií a vede k řadě reakcí, které vyústí v tvorbu membrány atakujícího komplexu (MAC) a lýze bakterií (Hovius et al. 2007).

Při zahájení imunitní odpovědi hostitele na infekci boreliemi hrají významnou roli Toll-like receptory (TLR) 1 a 2 nacházející se na povrchu fagocytů (Hirschfeld et al. 1999, Wooten et al. 2002, Wang et al. 2004). TLR 1 a 2 tvoří společně TLR1/2 heterodimer, který

rozpoznává triacyl lipoproteiny na povrchu bakterií, což vede k aktivaci makrofágů a jiných fagocytů a k následné produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 či IL-23 (Randolph et al. 1995, Knauer et al. 2007, Oosting et al. 2011), k produkci adhezních molekul a tvorbě superoxidu a oxidu dusnatého makrofágy a neutrofilů (Morrison et al. 1997). Všechny tyto reakce pak vyústí v likvidaci spirochet. Na místo infekce infiltrují také dendritické buňky, neutrofilů a monocytů (Steere et al. 2004). Kromě TLR hrají při rozpoznání spirochet borelií důležitou roli také další receptory, a to především NOD 2 (nucleotide-binding oligomerization domain protein) spolu s adaptorovou molekulou RICK (receptor-interacting serine/threonine kinase) na povrchu makrofágů a manosový receptor na povrchu fagocytů, jehož exprese je zvýšena při infekci boreliemi (Oosting et al. 2010, Cinco et al. 2001).

Zdá se, že důležitou úlohu v rozpoznání spirochet hraje také adaptorová molekula MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), která je klíčovou signální molekulou pro většinu TLR a hraje roli při fagocytóze bakterií (Fikrig et al. 2009, Shin et al. 2008).

Prvním z mechanismů, které umožňují boreliím přežít v hostiteli, je inhibice komplementu inaktivací C3b složky. Borelie exprimují na svém povrchu CRASP proteiny (complement regulator-acquiring surface protein), a Erp proteiny (Osp E/F-related proteins) vážící se na faktor H a faktor H-like protein (reconnectin), které jsou přirozenými inhibitory komplementu (Helwage et al. 2001, Kraiczy et al. 2001). Schopnost borelií inhibovat komplement však kolísá mezi jednotlivými druhy (Kurtenbach et al. 1998).

Mezi další mechanismy patří změna exprese některých povrchových proteinů. Nejznámějším je VlsE protein (variable major protein-like sequence) kódovaný plasmidem lp28. *Vls* lokus během infekce hostitele podléhá náhodné rekombinaci, která vyústí ve značnou antigení variabilitu tohoto proteinu (Liang et al. 2004). Současně se zvýšením exprese VlsE proteinu dochází ke snížení exprese jiného povrchového lipoproteinu OspC (outer surface protein C). Tento protein je důležitý v počáteční fázi infekce, je však velmi silným imunogenem, a tak je jeho produkce v průběhu infekce potlačena. Z tohoto důvodu hrají protilátky proti OspC významnou roli v počáteční fázi infekce, avšak nejsou účinné v perzistentní fázi infekce (Liang et al. 2002).

Při přežití borelií v hostiteli hrají významnou roli také proteiny borelií, které se váží na složky extracelulární matrix. Tato vazba zřejmě pomáhá přežít boreliím v počáteční fázi infekce a také napomáhá jejich diseminaci v organismu a následnému přetrvávání v cílových orgánech. Mezi tyto proteiny patří DbpA a DbpB (decorin-binding proteins), které se váží na

dekorin, BBK32 vázající fibronectin, Bgp (glycosaminoglycan-binding protein) vázající se na proteoglykany a P66, který se váže na integriny (Guo et al. 1998, Probert a Johnson 1998, Parveen et al. 2006, Coburn a Cugini 2003). Při průchodu borelií endoteliální vrstvou a jejich diseminaci v organismu jsou důležité také proteiny ErpA, P a C, které se váží na plasminogen. Vazba patogenů na plasminogen a jeho následná aktivace umožní bakteriím rozrušit extracelulární matrix a membrány a vstoupit do krevního řečiště (Brisette et al. 2009). Některé studie však naznačují, že tyto proteiny nejsou pro infekci hostitele boreliemi nepostradatelné (Shi et al. 2006, Li et al. 2006).

Lazarus a kolektiv také ukázali, že živé borelie mohou potlačit funkci makrofágů zvýšenou produkcí IL-10 (Lazarus et al. 2008).

Další zajímavou strategií borelií v boji proti přirozeným imunitním reakcím hostitele je absence fyziologické potřeby železa těmito spirochetami. Ty na rozdíl od jiných bakterií velmi omezily množství železa nutné pro růst a přežití v hostiteli. Tato výhoda jim pomáhá obejít limitované množství železa v hostitelském prostředí, které je pro jiné patogeny překážkou. Navíc se tím borelie vyhnou možnému napadení hostitelským systémem, pro něž jsou enzymy obsahující železo jedním z cílů (Posey a Gherardini 2000).

1.4. KLÍŠTĚ

1.4.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Klíšťata jsou vysoce specializovaní, obligátní, krev sající ektoparazité, kteří sají na širokém spektru hostitelů zahrnujícím savce, ptáky, plazy a obojživelníky po celém světě (Anderson a Magnarelli 2008). Z tohoto důvodu jsou klíšťata hned po komárech druhými nejčastějšími přenašeči lidských patogenů (Parola a Raoult 2001).

Taxonomicky zařazujeme klíšťata do kmene Arthropoda, podkmene Chelicerata, třídy Arachnida, řádu Acarina a podřádu Ixodida. Podřád Ixodida dále můžeme rozlišit na čtyři čeledi, z nichž hlavní jsou Ixodidae, neboli „tvrdá klíšťata“, která se vyznačují přítomností hřbetního štítku, a Argasidae, nazývaná také „měkká klíšťata“ která mají ohebnou kutikulu (Oschmann et al. 1999, Gray et al. 2002). Další dvě čeledi Nuttalliedae a Laelaptidae zahrnují pouze po jednom zástupci a nejsou z medicínského a veterinárního hlediska důležité (Anderson a Magnarelli 2008).

Klíšťata z čeledí Ixodidae a Argasidae se kromě rozdílné morfologie odlišují také rozdílnou strategií při získávání potravy, tedy krve. Ixodidae potřebují k plnému nasátí několik dní, během nichž zůstávají pevně přichyceni ke svému hostiteli, zatímco Argasidae

vyžadují pouze pár minut či hodin opakovaného sání, během něhož nejsou ke svému hostiteli pevně přichyceni (Bergman 1996).

Nejvýznamějším zástupcem čeledi Argasidae je *Ornithodoros moubata*, který je přenašečem *Borrelia duttoni*, původce návratné horečky u lidí. Čeleď Ixodidae může být dále rozdělena na Metastriata, kam patří například rody *Dermacentor* a *Rhipicephalus* a Prostriata, mezi které patří rod *Ixodes* (Francischetti et al. 2009). Z hlediska přenosu patogenů na člověka je jednoznačně nejvýznamnější právě rod *Ixodes*. Klíšťata tohoto rodu, především *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus* a *I. pacificus*, se významně podílí na přenosu závažných lidských patogenů, jako jsou komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Francisella tularensis* či virus klíšťové encefalitidy (Gray et al. 2002).

1.4.2. ŽIVOTNÍ CYKLUS

Z hlediska významu pro přenos patogenů na člověka je hlavní výzkum zaměřen na americké klíště *Ixodes scapularis* a evropské klíště *Ixodes ricinus*. *I. scapularis* je rozšířen především ve východní polovině USA a na jihovýchodě Kanady, zatímco *I. ricinus* najdeme na většině území Evropy. V posledních letech byl zaznamenán posun výskytu *I. ricinus* do vyšších nadmořských výšek a s tím spojený nárůst výskytu některých lidských patogenů v těchto oblastech (Danielová et al. 2006). Životní cyklus těchto dvou klíšťat zahrnuje tři vývojová stádia: larvu, nymfu a dospělce. Každé stádium saje krev ze svého hostitele několik dní, což poskytuje hostitelskému imunitnímu systému příležitost k obraně, která vede ke zhoršení sání klíštěte až k jeho odpadnutí (Bergman 1996). Sání larev trvá dva až tři dny, nymf tři až pět dní a dospělé samice sají sedm až devět dní. Dospělí samci sají krev pouze výjimečně. Tato klíšťata patří mezi tzv. trojhostitelské druhy, což znamená, že každé stádium saje na jiném hostiteli.

Po nasátí opouští každé stádium hostitele a další vývoj probíhá v opadance. Samice jsou schopny kopulovat až po částečném nasátí krve, a to buď přímo na hostiteli, nebo mimo něj, posléze kladou vajíčka, jejichž počet se pohybuje průměrně okolo dvou tisíc. Celý vývoj trvá za příznivých podmínek dva až tři roky (Oschmann et al. 1999, Anderson a Magnarelli 2008).

Ixodes ricinus i *I. scapularis* patří mezi tzv. non-nidikolní klíšťata, což znamená, že je můžeme nalézt ve volné vegetaci. Tento fakt má za následek, že tyto druhy přijdou do kontaktu s člověkem častěji než klíšťata takzvaně nidikolní, která žijí v úkrytech svých

hostitelů, a proto jsou také nejčastějšími přenosci patogenů na člověka (Gern a Humair 2002).



Obr.3. Vývojová stádia *Ixodes ricinus* (Parola a Raoult 2001)



Obr.4. Vývojová stádia *Ixodes scapularis* (www.aldf.com)

1.5. INTERAKCE KLÍŠTĚTE S IMUNITNÍM SYSTÉMEM HOSTITELE

Sání klíšťat je velmi komplexní a náročný proces, který u klíšťat z čeledi Ixodidae trvá obvykle několik dní. V jeho průběhu musí klíště rozrušit vrstvu epidermis a vytvořit ránu, která se naplní krví, tzv. „feeding pool“. Během celého procesu uvolňuje klíště ze slinných žláz řadu molekul, které mu umožňují jednak pevné přichycení v místě sání a také usnadňují samotné sání krve a ochraňují jej před napadením hostitelským imunitním systémem. Tento fyzikální a chemický útok na imunitní systém hostitele vyústí v silnou hemostatickou a závažnou imunitní odpověď. Sající klíště vyvolává přirozenou i adaptivní imunitní reakci.

Jako první přijdou do kontaktu se slinami a sacím ústrojím klíštěte buňky trvale přítomné v epidermis a dermis, mezi nimi například Langerhansovy buňky, žírné buňky či makrofágy. Tyto buňky uvolňují předem připravené mediátory, které zahájí imunitní reakci

apřilákají do místa sání další buňky (Francischetti et al. 2009). Takto vzniká v místě sání klíštěte lokální zánětlivá odpověď, na které se při sání na naivním hostiteli podílejí především neutrofilny (Brossard a Wikel 2004, Kovář 2004). Ty jsou první obrannou linií přirozeného imunitního systému. Kromě zabíjení invadujících mikroorganismů a produkce prozánětlivých cytokinů produkují neutrofilny také řadu chemoatraktantů, které se podílejí na přílivu dalších buněk během časné fáze infekce (Francischetti et al. 2009).

Získaná imunitní odpověď je zahájena kontaktem Langerhansových buněk kůže s klíštěcími imunogeny. Po kontaktu s antigeny migrují Langerhansovy buňky do spádových lymfatických uzlin, kde se přemění ve zralé dendritické buňky. Ty fungují jako antigen prezentující buňky (APC) pro T lymfocyty, stimulují jejich aktivaci a proliferaci (Brossard a Wikel 2004).

Při opakovaném sání klíštěte na hostiteli se mění poměr infiltrujících buněk av počáteční fázi infekce převažují především basofily a eosinofily. Ty vyvolávají takzvanou kožní basofilní hypersenzitivitu, která je typem oddálené hypersenzitivity (DTH) a podílejí se na ní Th1 lymfocyty (Allen 1973, Brossard a Wikel 2004). Tato reakce potom vede k poškození klíštěte, které se může projevit sníženou hmotností nasátého klíštěte až smrtí (Ribeiro et al. 1995).

Klíšťata si však vyvinula řadu účinných molekul, které ovlivňují imunitní systém hostitele a umožňují jim úspěšné sání. Sliny klíšťat obsahují především molekuly zabraňující srážení krve a molekuly s vazodilatačními, protizánětlivými a imunomodulačními vlastnostmi (Wikel a Bergman 1997).

1.5.1. ÚČINEK SLIN NA HOSTITELSKÝ IMUNITNÍ SYSTÉM

1.5.1.1. Molekuly s antihemostatickými vlastnostmi

Během sání klíštěte dochází k porušení krevních cév a krev volně vytéká do rány, kde ji může klíště nasávat. V běžném případě by bylo krvácení zastaveno hostitelským hemostatickým procesem, který zahrnuje řadu dějů vedoucích k zástavě krvácení. Tento proces by však nepříznivě ovlivňoval schopnost klíštěte sát krev. Z tohoto důvodu obsahují sliny klíšťat řadu molekul působících proti procesům srážení krve.

Tyto molekuly mohou působit na různých úrovních. Například enzym apyráza hydrolyzuje adenosin difosfát (ADP) a adenosin trifosfát (ATP) na adenosin monofosfát (AMP) a tím potlačuje agregaci destiček (Ribeiro et al. 1991). Dalšími inhibitory destiček

jsou například variabilin (Wang et al. 1996) či prostacyklin a disintegriny, které brání vazbě fibrinogenu na krevní destičky (Ribeiro et al. 1988).

Z dalších proteinů lze zmínit Ixolaris z klíštěte *Ixodes scapularis*, který inhibuje aktivaci faktoru X indukovanou pomocí TF/FVIIa (Francischetti et al. 2002). Navíc bylo prokázáno, že tento protein má antitrombotické vlastnosti (Nazareth et al. 2006). Mezi další antikoagulanty se řadí také proteiny Salp14 a Salp9 z *I. scapularis* (Narashiman et al. 2002).

1.5.1.2. Molekuly s imunomodulačními vlastnostmi

Molekuly obsažené v klíštěcích slinách mají kromě hemostázy výrazný vliv také na většinu buněk a nebuněčných složek imunitního systému. Díky tomu jsou klíšťata schopna sát po dobu několika dní, aniž by je obranná reakce hostitele výrazně poškodila a zabránila jim v úspěšném nasátí.

Významnou roli při potlačování obranné reakce imunitního systému sehraávají inhibitory komunikačních molekul. Schopnost imunitního systému rozpoznat cizí antigeny a odpovědět na ně závisí právě na produkci a uvolnění řady mediátorů, které posléze aktivují další složky imunity. Mezi tyto molekuly patří chemokiny, které řídí migraci buněk. Ve slinách klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* byly objeveny chemokiny vázající proteiny, které se nazývají evasiny. Tyto proteiny se váží například na CCL3 (MIP-1 α), CCL4, CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxin) a CXCL8 (IL-8) (Déruez et al. 2008). Také Marchalová a spol. potvrdili inhibiční účinky slin na IL-8 a MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1). V této práci je navíc uveden další inhibiční účinek slin, a to na alarminy. Alarminy jsou mediátory uvolňované keratinocyty a jejich úlohou je přitahovat a aktivovat antigen prezentující buňky, především dendritické buňky (Marchal et al. 2011).

Dalšími inhibovanými mediátory jsou histamin a serotonin. Tyto molekuly jsou uvolňovány při degranulaci žírných buněk a basofilů a podílí se na zánětlivé odpovědi. Ve slinách *Rhipicephalus appendiculatus* se nacházejí lipocaliny, které váží pouze histamin, zatímco ve slinách *Demacentor reticularis* se nachází homologní protein vázající histamin i serotonin (Paesen et al. 2000). Naopak ve slinách *Ixodes scapularis* se nachází histamin uvolňující faktor tHRF (tick histamine release factor), který se váže na basofily a stimuluje uvolnění histaminu. To má za následek zvýšenou propustnost cév a zvýšený přítok krve do rány, čímž je usnadněno sání klíštěte (Dai et al. 2010).

Mnoho molekul klíštěcích slin proteinového i neproteinového charakteru ovlivňuje přímo funkci řady buněk imunitního systému. Nejlépe prozkoumaným imunomodulačním

proteinem *I. scapularis* je Salp15. Tento protein má řadu vlastností, například ovlivňuje aktivaci a proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů. Účinky Salp15 spočívají v jeho schopnosti vázat se na CD4 koreceptor na T buňkách, což má za následek inhibici signálu vedeného přes TCR (T-cell receptor) a následně snížení produkce IL-2, který stimuluje proliferaci T buněk. Homologní protein ovlivňující proliferaci CD4⁺ T lymfocytů byl nalezen také u *Ixodes ricinus* (Anguita et al. 2002, Garg et al. 2006). Dalším proteinem potlačujícím funkci T lymfocytů je Iris ze slin *I. ricinus*, který inhibuje IFN- γ , IL-6 a IL-8, dále potlačuje produkci TNF- α makrofágy a navíc je inhibítozem serinových proteáz (elastáza z lidských leukocytů - HLE, trombin, tkáňový plasminogen aktivátor - t-PA, factor Xa) a má antihemostatické účinky (Leboulle et al. 2002, Prevot et al. 2006, Prevot et al. 2009). Nedávno byl prokázán také inhibiční vliv sialostatinu L z *I. scapularis* na produkci interleukinu 9 Th9 lymfocyty a tím na potlačení symptomů astmatu u myši. Tento protein má také protizánětlivé účinky a je inhibítozem cysteinových proteáz, především katepsinu L a C. Inhibicí těchto enzymů dochází také k inhibici aktivace serinových proteáz obsažených v granulech cytotoxických lymfocytů (CTL), NK buněk, žírných buněk a neutrofilů. Sialostatin L také inhibuje proliferaci CTL, migraci neutrofilů a ovlivňuje funkci dendritických buněk (Horká et al. 2011, Kotsyfakis et al. 2006, Sá-Nunes et al. 2009). Příbuzným tohoto proteinu je sialostatin L2. Tyto proteiny sdílí stejnou inhibiční aktivitu vůči katepsinu L, ale liší se ve schopnosti inhibovat katepsin S. Expres sialostatinu L2 se navíc na rozdíl od sialostatinu L zvyšuje během sání klíštěte a zdá se, že tento protein hraje stejně jako Salp15 roli při přenosu spirochet *Borrelia burgdorferi* do hostitele (Kotsyfakis et al. 2007, Kotsyfakis et al. 2010).

Mezi molekuly ovlivňující imunitní buňky patří také B-cell inhibitory protein z *I. ricinus*, který potlačuje aktivaci B-lymfocytů během počáteční fáze infekce (Hannier et al. 2004). Proteiny ISL 929 a ISL 1373 z *I. scapularis* zase potlačují produkci kyslíkových radikálů neutrofilů a tím inhibují jejich funkci (Guo et al. 2009). Dalším nedávno objeveným proteinem ovlivňujícím neutrofilů je IRS-2, jehož účinek bude popsán v kapitole 1.8.1. Proteiny obsažené ve slinných žlázách ovlivňují také aktivaci NK buněk (Kopecký a Kuthejlová 1998, Kubeš et al. 1994).

Řada molekul klíštěcích slin interaguje také s makrofágy a dendritickými buňkami a ovlivňuje jejich funkce. Tyto molekuly a jejich účinky jsou popsány v samostatných kapitolách.

1.6. VZÁJEMNÝ VZTAH KLÍŠTĚ – BORELIE

Klíště obvykle získá borelie v larválním stádiu společně s krví při sání na infekční myši. Spirochety jsou poté udržovány v klíštěti po celý životní cyklus díky transstadiálnímu přenosu. Primárně borelie osidlují lumen střeva, kde se pomocí povrchového lipoproteinu A (OspA), který je zvýšeně exprimován, přichytí ke klíštěcímu receptoru TROSPA (tick receptor for OspA). Tato interakce zajistí ukotvení borelií ve střevě klíštěte a zároveň je chrání před obrannými mechanismy klíštěte (Pal et al. 2004). Dalším povrchovým lipoproteinem, který se podílí na přichycení a udržení borelií ve střevě, je povrchový lipoprotein B (OspB) (Neelakanta et al. 2007).

Během dalšího sání klíštěte dojde k aktivaci spirochet, jejich zmnožení a rozšíření do dalších orgánů, především pak slinných žláz, odkud poté borelie vstupují do hostitele. Podle dosavadních poznatků tento proces migrace borelií ze střeva klíštěte do slinných žláz a následný přenos do hostitele vyžaduje optimálně 48 až 60 hodin. Během této doby dojde vlivem změny vnějších signálů (pH, teploty) během sání krve a vlivem RpoN/RpoS sigma faktorů ke změně genové exprese spirochet, především pak ke snížení exprese OspA a naopak zvýšení exprese povrchového lipoproteinu C (OspC) (Schwan et al. 1995, Stevenson et al. 1995, Carrol et al. 1999). Tento lipoprotein usnadňuje migraci spirochet ze střeva do slinných žláz klíštěte a je nezbytný pro infekci hostitele (Gilmore et al. 2000, Schwan 2003, Fingerle et al. 2007).

Molekuly ze slin klíšťat usnadňují svými vlastnostmi přenos, přežití a množení borelií v hostiteli (Nuttall et al. 1994, Macháčková et al. 2006). Tento jev, kdy je přenos patogenů usnadňován slinami krevsajících vektorů, byl nazván SAT (saliva-assisted transmission) neboli slinami aktivovaný přenos patogenů (Jones et al. 1987). Poprvé byl tento fenomén zaznamenán u Thogoto viru, jehož vektorem je *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al. 1987, Jones et al. 1989). V současné době je SAT přímo i nepřímo znám u několika patogenů a jejich vektorů. V rámci komplexu *Bbsl* byl zaznamenán SAT u těchto druhů: *B. afzelii* a *Ixodes ricinus* (Pechová et al. 2002), *Bbss* a *Ixodes scapularis* (Zeidner et al. 2002), *B. garinii* a *Ixodes persulcatus* (Sato a Nakao 1997) a *B. lusitaniae* a *Ixodes ricinus* (Zeidner et al. 2002).

Zatím jediným známým SAT faktorem je protein Salp 15 z *I. scapularis* a jeho homolog z *I. ricinus* (Anguita et al. 2002, Ramamoorthi et al. 2005). Salp15 interaguje s povrchovým lipoproteinem OspC borelií a tím je chrání před protilátkami zprostředkovaným zabíjením, exprese tohoto proteinu je v přítomnosti spirochet zvýšená (Hovius et al. 2008). V nedávné době se však ukázalo, že i další protein ze slin *I. scapularis*

Sialostatin L2 podporuje přenos borelií do hostitele a mohl by tak být dalším SAT faktorem (Kotsyfakis et al. 2010).

1.7. BUŇKY PŘIROZENÉ IMUNITY

1.7.1. DENDRITICKÉ BUŇKY

1.7.1.1. Úloha dendritických buněk v imunitní odpovědi

Dendritické buňky jsou speciálním typem leukocytů, který vzniká z CD34 hematopoetických prekurzorů v kostní dřeni. Tyto prekurzory jsou krevním řečištěm roznášeny do různých orgánů, kde dávají vznik nezralým dendritickým buňkám. Mezi tyto orgány patří především tkáně, které hraničí s vnějším prostředím, tj. kůže, dýchací a trávicí trakt (Granucci et al. 2005, Lipscomb a Masten 2002). Zde nezralé dendritické buňky působí jako tzv. strážci imunitního systému, zachycují zde patogeny vstupující do těla. Po jejich zpracování migrují do spádových lymfatických uzlin, kde již zralé dendritické buňky prezentují antigeny těchto patogenů T lymfocytům a spouští tak specifickou imunitní reakci (Banchereau a Steinman 1998, Granucci et al. 2005). Dendritické buňky tak hrají mezi ostatními buňkami imunitního systému jedinečnou úlohu – spojují nespecifickou imunitu se specifickou.

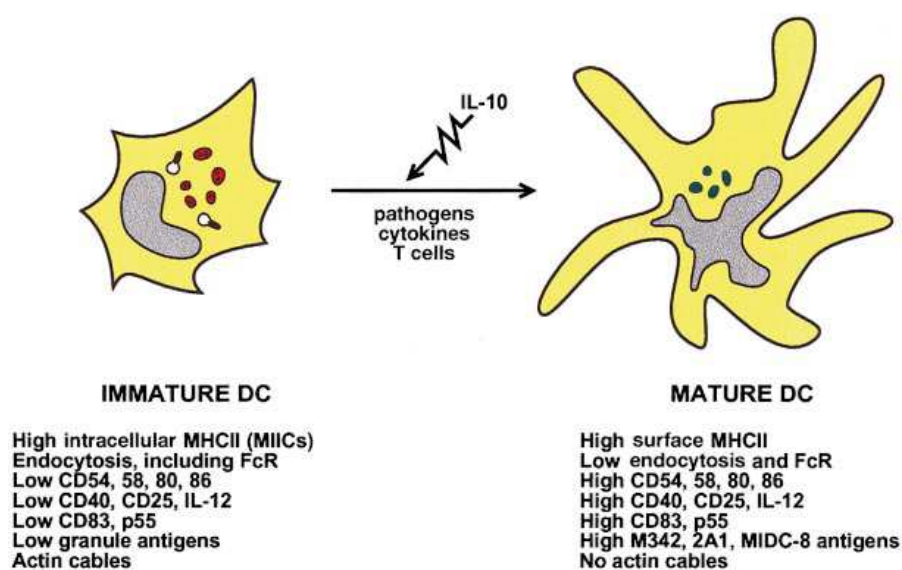
K rozpoznání patogenů dochází pomocí speciálních receptorů tzv. pattern-recognition receptors (PRR) na povrchu dendritických buněk, ty rozeznávají specifické struktury patogenů tzv. PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Mezi tyto struktury patří například lipopolysacharid z Gramnegativních bakterií, lipoproteiny, peptidoglykany, mikrobiální DNA bohatá na CpG motiv, jedno- a dvouřetězcová virová RNA či flagelin. Všechny tyto struktury jsou vysoce konzervovány mezi patogeny a nenachází se u savců (Granucci et al. 2005). Kromě mikrobiálních podnětů mohou být nezralé dendritické buňky aktivovány také látkami produkovanými při poškození tkáně či zánětlivými cytokiny.

Mezi nejvýznamnější PRR patří především Toll-like receptory (TLR). V současné době je známo 12 TLR. V rozpoznání bakterií hrají úlohu TLR2, který může vytvářet heterodimery s TLR1 a TLR6 a rozeznává diacyl- (TLR2/TLR6) či triacyl- (TLR2/TLR1) lipopeptidy. Samotný TLR2 může dále rozpoznávat například peptidoglykany či kyselinu lipoteichoovou z Grampozitivních bakterií. TLR1 je zapojen v rozpoznání vnějších povrchových lipoproteinů *Borrelia burgdorferi*. TLR4 rozpoznává LPS Gramnegativních bakterií, TLR5 reaguje na flagelin a TLR9 rozpoznává CpG motivy bakteriální DNA (Akira

et al. 2006, Takeda a Akira 2005). Z dalších PRR lze zmínit lektiny, které rozpoznávají karbohydrátové skupiny. Velmi významným lektinovým receptorem je DC-SIGN, vazba na tento receptor napomáhá některým bakteriím v přežití (van Kooyk a Geijtenbeek 2003).

Po rozpoznání patogenních struktur pomocí PRR dojde k pohlcení patogenů pomocí fagocytózy, makropinocytózy či endocytózy (Banchereau a Steinman 1998, Wilson et al. 2004). Internalizace cizích patogenů spouští dozrávání dendritických buněk a jejich migraci z periferních tkání do lymfoidních orgánů. Během této přeměny nezralých dendritických buněk na zralé dochází k řadě fenotypických a funkčních změn, které zahrnují redistribuci MHC molekul z vnitrobuněčných oddílů na povrch buňky, potlačení schopnosti internalizace antigenů, zvýšení exprese kostimulačních molekul, zvýšení sekrece chemokinů, cytokinů a adhezních molekul (Banchereau a Steinman 1998).

Zralé dendritické buňky se usazují v T-buněčné oblasti spádových lymfatických uzlin, kde interagují s antigen-specifickými T-lymfocyty. Tato interakce zahrnuje navázání TCR T lymfocytů na komplex MHCII s antigenem. Za přítomnosti dalších kostimulačních molekul dojde ke klonální proliferaci T a B lymfocytů, produkci cytokinů a tím k vývoji specifické imunitní reakce. Vývoj imunitní reakce směrem k typu Th1, Th2 či Th17 závisí na povaze antigenního stimulu, repertoáru produkovaných cytokinů a aktuálního cytokinového prostředí. Tak například antigeny vyvolávající sekreci IL-12 vedou k polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1, zatímco produkce IL-4, IL-10 či potlačení produkce IL-12 vedou k Th2 polarizaci a zvýšená produkce TGF- β či IL-23 vede k diferenciaci Th17 buněk (Banchereau a Steinman 1998, Cella et al. 1996, Miller et al. 2007).



Obr. 5. Srovnání nezralé a zralé dendritické buňky (Banechereau a Steinman 1998)

1.7.1.2. Účinek slin na dendritické buňky

Dendritické buňky patří mezi antigen prezentující buňky a jako takové hrají klíčovou roli v zahájení imunitní odpovědi v reakci na invadující patogeny. Vystavení dendritických buněk slinám *Ixodes ricinus* in vitro vede k inhibici jejich maturace po stimulaci CD40 či TLR9, 3 a 7 ligandy a ke snížení schopnosti prezentace antigenu. In vivo pak dochází k inhibici maturace a časně migrace dendritických buněk do spádových lymfatických uzlin a ke snížené schopnosti zralých dendritických buněk v lymfatických uzlinách prezentovat antigen specifickým T lymfocytům. Navíc dendritické buňky vystavené slinám nejsou schopné dostatečně indukovat Th1 a Th17 imunitní odpověď, ale směřují reakci směrem k Th2. Stejný posun imunitní reakce směrem k Th2 pozorovali také Mejri a Brossard (Skallová et al. 2008, Mejri a Brossard 2007).

Klíštěcí sliny také indukují vznik regulačních dendritických buněk, které produkují zvýšené množství IL-10 a snížené množství IL-12 a TNF- α po stimulaci TLR ligandy. Tyto regulační dendritické buňky exprimují ve zvýšené míře TLR2 a inhibují ERK a p38 kinázy, což podporuje produkci IL-10 a tím modulaci imunitní odpovědi (Oliveira et al. 2010).

Naproti tomu Slámová a kolektiv pozorovali po aktivaci boreliemi za přítomnosti slin *Ixodes ricinus* snížení produkce jak TNF- α a IL-6, tedy Th1 cytokinů, tak i snížení produkce IL-10, tedy Th2 cytokinu, dendritickými buňkami. Navíc vystavení dendritických buněk aktivovaných *Borrelia afzelii* slinám *I. ricinus* vedlo ke snížení procenta fagocytujících buněk a ke snížené schopnosti dendritických buněk aktivovat boreliově specifické T-lymfocyty (Slámová et al. 2011).

Inhibice dozrávání a diferenciací dendritických buněk z kostní dřeně byla pozorována i po vystavení buněk aktivovaných GM-CSF a IL-4 či LPS slinám *Rhipicephalus sanguineus* (Cavassani et al. 2005).

Nově byla také publikována práce, která prokazuje inhibici dendritických buněk slinami *I. ricinus* na úrovni signálních drah po stimulaci LPS či *B. afzelii*. Konkrétně se jedná o potlačení aktivace STAT-1, který je součástí interferonové signální dráhy (Lieskovská a Kopecký 2012).

Nedávno byly ve slinách *I. scapularis* a *R. sanguineus* objeveny neproteinové molekuly prostaglandin E2 (PGE2) a purin nucleosid adenosin (ADO), které se zdají být zodpovědné za většinu inhibiční aktivity slin. Obě molekuly inhibují indukci signální dráhy cAMP-PKA produkci IL-12p40 a TNF- α a zvyšují produkci IL-10 po stimulaci TLR ligandy. Navíc inhibují expresi CD40 u zralých dendritických buněk a PGE2 potlačuje

diferenciaci dendritických buněk z krevních prekursorů (Sá-Nunes et al. 2007, Oliveira et al. 2011).

Funkci dendritických buněk ovlivňuje také protein Salp15 z *I. scapularis*. Tento protein interaguje s lektinem DC-SIGN, což má za následek aktivaci Raf1/MEK kaskády a následné snížení stability IL-6 a TNF- α mRNA a zhoršení remodelace nukleosomu na IL-12p35 promotoru. K této inhibici prozánětlivých cytokinů dochází jak po aktivaci buněk LPS (lipopolysacharid) a LTA (kyselina lipoteichoová), tak i boreliemi (Hovius et al. 2008).

Dalším proteinem z *I. scapularis*, který interaguje s dendritickými buňkami, je sialostatin L. Inkubace dendritických buněk aktivovaných LPS s tímto proteinem vede ke snížení produkce IL-12p70 a TNF- α a k potlačení dozrávání buněk snížením exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86. Navíc sialostatin L se váže na katepsin S uvnitř dendritických buněk a ovlivňuje zpracování invariantního řetězce MHCII, což má za následek zhoršené dozrávání buněk a tím inhibici antigen-specifické proliferace CD4+ T lymfocytů mechanismem závislým na katepsinu S (Sá-Nunes et al. 2009).

1.7.2. MAKROFÁGY

1.7.2.1. Úloha makrofágů v imunitní odpovědi

Makrofágy patří společně s neutrofily a dendritickými buňkami mezi tzv. profesionální fagocyty, buňky zodpovídající za rozpoznání a likvidaci patogenů a mrtvých buněk. Vznikají z hematopoetických prekursorů v kostní dřeni, které přímo či prostřednictvím monocytů diferencují na tkáňové makrofágy. Ty mohou migrovat po celém těle a zúčastnit se zánětlivé odpovědi nebo mohou přebývat v různých orgánech v podobě rezidentních makrofágů, lišících se mezi sebou jak morfologicky tak fenotypicky. Tyto rezidentní makrofágy jsou v tkáních přítomny i bez zánětu a zúčastňují se likvidace apoptotických buněk (Gordon a Martinez 2010).

Monocyty za běžných okolností cirkulují v krvi velmi krátkou dobu a podstupují spontánní apoptózu (Fahy et al. 1999). Během zánětu však za působení diferenciačních faktorů jako jsou GM-CSF či M-CSF nepodlehnu naprogramované apoptóze, ale diferencují se na makrofágy s dlouhou životností (Parihar et al. 2010).

Během této přeměny v makrofágy jsou monocyty vystavovány různým koncentracím cytokinů a dalších mediátorů, které mají za následek aktivaci nově vzniklého makrofágu. Makrofágy mohou být aktivovány dvojím způsobem, přičemž způsob aktivace rozhoduje

o vývoji imunitní reakce směrem k Th1, aktivace pomocí IFN- γ a LPS, či k Th2 reakci, která vzniká po alternativní aktivaci makrofágu pomocí IL-4 či IL-13 (Gordon a Martinez 2010, Martinez et al. 2008). K plné aktivaci makrofágů je však kromě cytokinového mikroprostředí třeba také rozpoznání patogenu pomocí specifických receptorů. Zánětlivé makrofágy mají na svém povrchu stejně jako dendritické buňky celou řadu PRR, pomocí kterých interagují s molekulami na povrchu patogenů; kromě TLR exprimují makrofágy také scavengerové receptory či integriny (Aderem a Underhill 1999, Geismann et al. 2010).

Po aktivaci makrofágu dochází k celé řadě reakcí, které mají za následek fagocytózu, uvolnění antibakteriálních a proteolytických enzymů, chemokinů, celé řady prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku a dusíku, jež vyúsťují v zabití patogena a ukončení zánětlivé odpovědi. Po ukončení zánětlivé reakce jsou přeživší makrofágy deaktivovány a podstoupí funkční změny, které jim umožní vykonávat funkce rezidentních makrofágů ve tkáních (Gordon a Martinez 2010).

1.7.2.2. Účinek slin na makrofágy

Makrofágy sehrávají důležitou roli v místě sání klíštěte. Kromě zvýšené sekrece chemoatraktantů, růstových faktorů a cytokinů, které do místa infekce přitahují další buňky imunitního systému, jsou také schopny pomocí fagocytózy velmi rychle degradovat invadující patogeny (Kramer et al. 2011). Klíštěcí sliny proto obsahují celou řadu komponent ovlivňujících funkce těchto buněk, které jim pomáhají v pozdržení či potlačení imunitní odpovědi hostitele.

Extrakt ze slinných žláz (SGE) *Ixodes ricinus* snižuje produkci dvou hlavních obranných molekul makrofágů, superoxidu a oxidu dusného po aktivaci buněk *Borrelia afzelii* (Kuthejlová et al. 2001). SGE z *I. ricinus* také snižuje počet makrofágů schopných fagocytovat *B. afzelii* a počet pohlcených bakterií. Dále SGE a sliny z *I. ricinus* snižují produkci prozánětlivého cytokinu TNF- α . Rozdílný je však vliv SGE a slin na regulaci produkce oxidu dusného makrofágy. Zatímco SGE produkci této molekuly snižuje, sliny ji zvyšují (Kýčková a Kopecký 2006). Na potlačení produkce TNF- α makrofágy se podílí serpin z *I. ricinus* Iris, který ovlivňuje produkci TNF- α přímou vazbou na makrofágy a monocyty. Schopnost této inhibice nesouvisí s antiproteázovou aktivitou tohoto proteinu (Prevot et al. 2009).

Vliv extraktu ze slinných žláz na myší makrofágy byl pozorován také u *Rhipicephalus microplus*. SGE z tohoto klíštěte v závislosti na koncentraci indukuje rozdílnou expresi

kostimulační molekuly CD86, což má nejspíše za následek podporu Th2 polarizace imunitní reakce (Brake et al. 2010).

Nedávno byl popsán také inhibiční vliv slin *Dermacentor variabilis* na fagocytózu zymozanových kuliček liniovými makrofágy IC-21. Navíc následkem inkubace se slinami dochází ke zvýšené migraci těchto buněk a ke zvýšené produkci Th2 cytokinu IL-10. Sliny z tohoto klíštěte také ovlivňují genovou expresi některých molekul (Kramer et al. 2011).

1.8. PROTEINY SLINNÝCH ŽLÁZ – SERPINY

Serpiny představují rozsáhlou rodinu strukturálně podobných avšak funkčně značně heterogenních proteinů. Nacházejí se v celé řadě organismů od virů až po obratlovce či rostliny, kde hrají roli v celé řadě biologických procesů. Podílí se například na srážení krve, fibrinolýze, programované buněčné smrti či rozvoji zánětu (Potempa et al. 1994, Carrell et al. 1987, Silverman et al. 2001). Většina serpinů se řadí mezi inhibitory serinových proteáz, odtud také vznikl název serpiny (serine protease inhibitor), avšak některé serpiny mohou být také inhibitory cyteinových proteáz či vůbec nemají inhibiční aktivitu (Gettins 2002).

Serpiny jsou jednořetězcové proteiny o velikosti 350 až 400 aminokyselin. Je pro ně typická struktura skládající se ze tří β listů (A,B,C) a sedmi až devíti α helixů (Gettins 2002, Khan et al. 2011). Charakteristickým znakem serpinů je reaktivní centrální smyčka RCL (reactive center loop), což je proteinový motiv složený z dvaceti aminokyselin umístěný blízko C-konce proteinu. V tomto motivu se nachází snadno štěpitelná vazba umístěná mezi takzvanými P1 a P1' zbytky. Právě tato vazba je štěpena cílovou proteázou. Jakmile daná proteáza vazbu rozštěpí, dojde k strukturním změnám, které vedou ke vzniku ireverzibilních komplexů a nevratné inaktivaci obou partnerů (Prevot et al. 2006).

U klíšťat rodu *Ixodes* byla identifikována celá řada serpinů na úrovni sekvence DNA, například u klíštěte *I. scapularis* bylo identifikováno čtyřicet pět genů kódujících serpiny (Mulenga et al. 2009). Naproti tomu doposud byly funkčně charakterizovány pouze dva proteiny z *I. ricinus*, a to Iris a IRS-2 (Leboulle et al. 2002, Chmelař et al. 2010).

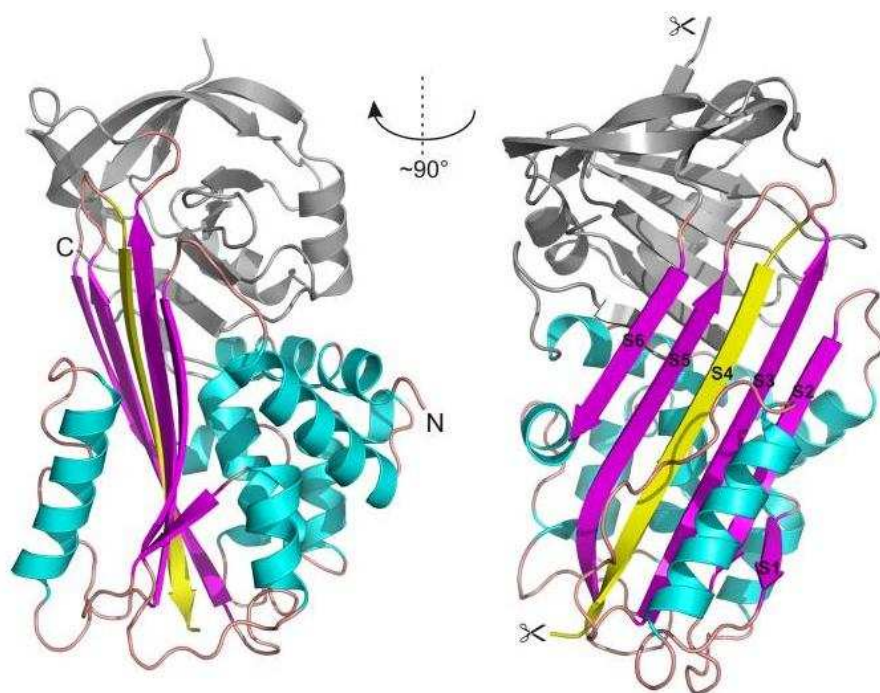
1.8.1. IRS-2

IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin-2) je druhým nedávno charakterizovaným serpinem z *I. ricinus*. Cílovými enzymy tohoto proteinu jsou chymotrypsinu podobné serinové proteázy katepsin G a chymáza. Oba tyto enzymy jsou zapojené v akutní zánětlivé odpovědi a jsou

produkovány aktivovanými neutrofilými (katepsin G) a žírnými buňkami (chymáza). Katepsin G je také zapojen v buněčné signalizaci vedoucí k aktivaci a agregaci destiček, inhibicí tohoto enzymu tedy IRS-2 ovlivňuje shlukování destiček. Zároveň byla pozorována schopnost IRS-2 inhibovat trombin a tedy potlačovat shlukování destiček vyvolané touto cestou. Při dalších pokusech bylo zjištěno, že IRS-2 je schopen inhibovat otok a migraci neutrofilů do zanícené tkáně při uměle vyvolaném zánětu u myší.

Z uvedených účinků IRS-2 je patrné, že tento protein hraje důležitou roli při sání klíštěte, jelikož je schopen ovlivňovat jak rozvoj zánětu v místě sání, tak hojení vzniklé rány. Tomu odpovídá také exprese mRNA IRS-2, která se v průběhu sání zvyšuje.

Zajímavostí je, že IRS-2 je značně strukturně homologní s α -1-antichymotrypsinem, který je přirozeným regulátorem cathepsinu G a chymázy (Chmelař et al. 2010).



Obr. 6. Struktura IRS-2 (Chmelař et al. 2010)

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Stanovení vlivu klíštěcích rekombinantních proteinů IRS-2 a SPI na cytokinový profil myších dendritických buněk aktivovaných *Borrelia burgdorferi***
- 2) Optimalizace měření fagocytózy na průtokovém cytometru**
- 3) Stanovení míry fagocytózy borelií makrofágy v přítomnosti slin z klíštěte *Ixodes ricinus* a rekombinantních proteinů IRS-2 a SPI**

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

3.1.1. MYŠI

V pokusech byly použity samice inbredních myší kmene C3H/HeN a C57BL/6 (AnLab s.r.o.) ve stáří 8 týdnů. Dále pak samci cathepsin G „knockout“ (KO) myší s 129/S2/SVPasCrl pozadím ve stáří cca. 10 týdnů. KO myši byly laskavě poskytnuty Dr. T. Chavakisem z Univerzitní kliniky Carla Gustava Caruse v Drážďanech. U pokusů s cathepsin G KO myšmi byly jako kontrola použity samice inbredních myší kmene 129/S2/SVPasCrl (AnLab s.r.o.). Myši byly použity pro získání sleziny a následnou izolaci dendritických buněk. Všechny kmeny myší byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.2. BUNĚČNÁ LINIE

Pro pokusy zaměřené na fagocytózu byla použita myší makrofágová linie PMJ2-R. Tato linie vznikla z peritoneálních makrofágů myší kmene C57BL/6 in vivo infekcí J2 retrovirem nesoucím v-raf a v-myc onkogeny. Buňky byly kultivovány v D-MEM médiu doplněném 5% boviním fetálním sérem, 1% antibiotiky a 1% L-glutaminem (PAA-The Cell Culture Company). Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C a 5% CO₂.

3.1.3. BORELIE

K aktivaci buněk byly použity spirochety *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ATCC) pěstované v Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK-H) mediu (Sigma) s 6% králíčím sérem při 33°C. Před použitím byly borelie spočítány dle Magnusona (Magnuson 1948). Na podložní sklo bylo nanášeno 3,5 μl boreliové suspenze a překryto krycím sklem o rozměrech 18 × 18 mm. Poté byl v temném poli optického mikroskopu (zvětšení 400×) určen počet borelií v 20ti zorných polích. Výsledný počet borelií v 1 ml byl pak vypočítán podle vzorce:

$$\text{počet bor./ml} = \underline{a} * 7,7 * 10^5,$$

kde a znamená průměrný počet borelií ze 20ti zorných polí.

Následně bylo odebráno potřebné množství boreliové suspenze, které byla centrifugována při 8000 g. Stočené borelie byly resuspendovány v médiu v závislosti na dalším postupu.

3.1.4. PHRODO™ BIOPARTICLES® CONJUGATES

pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles® conjugates (Invitrogen) jsou částice konjugované s novým fluorescenčním barvivem pHrodo. Fluorescence tohoto barviva se zvyšuje s klesajícím pH. Tyto částice tedy neemitují fluorescenci v neutrálním prostředí vně buňky, ale jasně se rozsvítí uvnitř fagozomu, kde je pH značně kyselé, proto jsou vhodné ke stanovení fagocytózy.

Částice byly připraveny vždy těsně před pokusem.

3.1.5. REKOMBINANTNÍ PROTEINY

V pokusech byly používány dva rekombinantní proteiny. Protein IRS-2 byl laskavě poskytnut Dr. J. Chmelařem. Druhým používaným proteinem byl klíčecí inhibitor serinových proteáz o molekulové hmotnosti 10,7 kDa. Z důvodu potenciální patentové aplikace na tento protein bude v celé práci označován zkratkou SPI (serine protease inhibitor). Protein byl laskavě poskytnut Dr. M. Kotsyfakisem.

3.2. METODY

3.2.1. OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

3.2.1.1. Design pokusu

Pro tento pokus byly vyizolované dendritické buňky (DC) nanесeny na 96-jamkovou destičku a rozděleny do jednotlivých skupin. Tyto skupiny zahrnovaly nestimulované DC jako negativní kontrolu, DC stimulované LPS jako pozitivní kontrolu, DC stimulované boreliemi a DC stimulované boreliemi a ovlivněné jednotlivými proteiny (IRS-2, SPI). Z buněk byl postupně odebírán supernatant pro stanovení množství cytokinů, a to v časových intervalech 2 hodiny, 24 a 48 hodin.

Design pokusu byl shodný pro všechny kmeny myši. Pokusy byly prováděny v triplicacích. Pro větší přehlednost není negativní kontrola (nestimulované DC), ani pozitivní kontrola (DC stimulované LPS) v grafech uváděna.

3.2.1.2. Izolace dendritických buněk pomocí magnetické separace

Myši byly usmrčeny zlomením vazů a poté jim byla sterilně vyjmuta slezina. Ta byla v Petriho misce rozstříhána a přemístěna do 5 ml RPMI média (PAA-The Cell Culture Company) obsahujícího Liberasu DL (0,25 mg/ml, Roche) a DNázu I (0,2 mg/ml, Roche). Následovala 30-minutová inkubace v termostatu při 37 °C. Poté bylo médium s uvolněnými buňkami přefiltrováno přes 70µm sítko (BD Falcon) umístěné na 50 ml zkumavce, naředěno MACS pufrem (1mM EDTA v PBS) (Sigma) s 2% BOFES a stočeno při 170 g 10 minut. Supernatant byl opatrně slit a výsledný pelet byl resuspendován v 830µl MACS pufru s 2% BOFES (Sigma) a bylo k němu přidáno 50 µl CD11c Microbeads (MACS Miltenyi Biotec). Buňky byly inkubovány s kuličkami 15 min při 4 °C. Následně byl k suspenzi přidán desetinásobný objem MACS pufru s 2% BOFES a vše bylo stočeno 10 min při 170 g. Stočené buňky byly resuspendovány v 500 µl MACS s 2% BOFES a nanесeny na kolonku (MACS Miltenyi Biotec), která byla předtím nasazena na magnet a 3× promyta 3 ml MACS s 2% BOFES. Kolonka s nanесenými buňkami byla následně 3× promyta s 3 ml pufru. Poté byla odstraněna z magnetu a buňky byly eluovány 5 ml RPMI s 10% BOFES. Vyizolované buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce, stočeny 10 min při 170 g a resuspendovány v kompletním médiu (RPMI, 10% BOFES, 1 % antibiotika, 1 % L-glutamin a 0,1% 2-merkaptoetanol) (PAA-The Cell Culture Company).

Všechny nádoby a roztoky byly vychlazeny a celý postup byl prováděn na ledu. Uvedená množství jsou počítána pro jednu slezinu.

3.2.1.3. Aktivace dendritických buněk

Vyizolované dendritické buňky byly nanесeny na 96-jamkovou kultivační destičku (TPP) v objemu 200 µl na jamku. Výsledná koncentrace byla 1×10^6 buněk na 1 mililitr. Buňky byly inkubovány při 37 °C s 5% CO₂.

Aktivace buněk probíhala druhý den po izolaci. Z buněk bylo opatrně odebráno 100 µl média a nahrazeno jednotlivými aktivátory podle následujícího schématu:

Skupina představující pozitivní kontrolu byla aktivována 50µl roztoku LPS (Sigma) o výsledné koncentraci 500 ng/ml.

Srovnávací skupina byla aktivována boreliemi, které byly resuspendovány v kultivačním médiu a přidány v objemu 50 µl k buňkám. Počet borelií byl 10 spirochet na 1 buňku (2 mil. spirochet/200 tis. buněk/j.).

K dalším skupinám buněk byly kromě 50 µl borelií (2 mil. spirochet/200 tis. buněk/j.) přidány také rekombinantní proteiny IRS-2 a SPI. Tyto proteiny byly k buňkám přidávány v následujících schématech:

- I.** Proteiny přidány k buňkám současně s boreliemi
- II.** Proteiny preinkubovány s buňkami 4 hod. před přidáním borelií
- III.** Protein předem smíchan s boreliemi (5min) a suspenze následně přidána k buňkám. Toto bylo prováděno pouze s proteinem IRS-2 (IRS-2 + bor)

Výsledná koncentrace obou použitých proteinů byla 6 µM.

Ke skupině, která představovala negativní kontrolu, bylo přidáno 100 µl kultivačního média. Stejně tak ostatní skupiny byly doplněny kultivačním médiem, aby byl výsledný objem ve všech jamkách 200 µl.

Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% CO₂. V jednotlivých intervalech byly odebrány supernatanty pro stanovení cytokinů:

- I.** 2 hod. - odebráno 50 µl pro stanovení TNF-α
- II.** 24 hod. - odebráno 100 µl pro stanovení IL-6 a TNF-α
- III.** 48 hod. - odebráno 50 µl pro stanovení IL-10 či IL-12

3.2.1.4. Cytokinová ELISA

Pro stanovení koncentrace cytokinů byl použit Ready-Set-GO! ELISA Kit (e-Bioscience). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp), postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Absorbance byla měřena na vertikálním spektrofotometru (ELx 800 Fluorescence microplate reader, BioTek) při 450nm.

3.2.2. STANOVENÍ ÚROVNĚ OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINU DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

3.2.2.1. Design pokusu

Ve vybraném případě byla pomocí RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) zkoumána úroveň ovlivnění produkce daného cytokinu. Dendritické buňky byly izolovány a aktivovány stejným způsobem, jak je popsáno výše. Pouze skupiny s přidáním proteinem byly zredukovány na jednu skupinu, kde byl protein přidán zároveň s boreliemi. RNA byla izolována po 6 a 12 hodinách inkubace.

3.2.2.2. Izolace RNA z aktivovaných dendritických buněk

RNA byla izolována pomocí Nucleic acid and protein purification kitu (Macherey-Nagel). Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Vyizolovaná RNA byla ihned převedena na cDNA.

3.2.2.3. Reverzní transkripce

Vyizolovaná RNA byla zakoncentrována ve Speedvacu cca 30 min při 2500 RPM. Po vypaření zůstalo v každém vzorku 9 μ l koncentrované RNA, ke které bylo přidáno 10 μ l RT pufru a 1 μ l enzymu reverzní transkriptázy (High capacity RNA-to-c DNA kit) (Applied Biosystems). Následně byla suspenze ponechána 1 hod při 37 °C na suché lázni. Posledních 5 min byla teplota zvýšena na 90 °C, aby došlo k degradaci enzymu. Vzorky byly poté uchovány v lednici do druhého dne, kdy byla provedena real-time PCR.

3.2.2.4. Reverse-transcription PCR

Expres mRNA daného cytokinu byla zjišťována pomocí TaqMan Gene Expression kitu (Applied Biosystems), který obsahoval primery i sondu pro hledaný úsek. Reakční objem byl 20 μ l: 18 μ l reakční směsi + 2 μ l cDNA.

Složení reakční směsi (18 μ l):

10 μ l FastStart Universal Probe Master(ROX) (Roche)

1 μ l TaqMan Gene Expression kit (Applied Biosystems)

7 μ l MiliQ H₂O

Jako referenční gen byl použit β -aktin. Amplifikace probíhala v přístroji Rotor Gene (Corbett Research). Pro každý vzorek byla reakce prováděna celkem v pěti opakováních.

Výsledná relativní hodnota exprese mRNA byla vypočítána srovnávací C_T metodou z následujícího vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ genu sledovaného cytokinu} - C_T \text{ referenčního genu } (\beta\text{-aktin})) \text{ stimulovaný vzorek} - (C_T \text{ genu sledovaného cytokinu} - C_T \text{ referenčního genu } (\beta\text{-aktin})) \text{ kontrolní nestimulovaný vzorek}],$$

kde C_T představuje cyklus, ve kterém fluorescenční signál překročí tzv. threshold.

3.2.3. OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY MAKROFÁGŮ

3.2.3.1. Design pokusu

Pro tento pokus byla použita makrofágová linie PMJ2-R. K buňkám byly přidány CFSE značené borelie či pHrodo partikule a byla zkoumána jejich fagocytóza makrofágy v časových intervalech 10 min, 30 min, 60 min, 120 min a 240 min. V každém pokusu a pro každý časový interval byla zařazena skupina buněk pouze s boreliemi či pHrodo a skupina, kde byly buňky před přidáním CFSE borelií či pHrodo preinkubovány s proteiny či slinami.

Pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.3.2. Příprava buněk

Makrofágová linie PMJ2-R byla 2 dny před zahájením samotného pokusu nasazena na 96 jamkovou kultivační destičku (TPP). Výsledná koncentrace buněk byla 1×10^6 buněk na 1 ml. Dvacet čtyři hodin před pokusem byla buňkám vyměněna polovina média a byly aktivovány přidáním LPS o výsledné koncentraci 500ng/ml. Proteiny (SPI a IRS-2) v koncentraci 6 μ M a sliny v koncentraci 10 μ g/ml byly preinkubovány s buňkami 4 hod. před samotnou fagocytózou CFSE borelií či pHrodo. Buňky byly po celou dobu fagocytózy v termostatu při 37 °C a 5% CO₂.

3.2.3.3. Příprava borelií značených CFSE a pHrodo kuliček

I. pHrodo částice byly připraveny přidáním 2 ml 20mM HEPES o pH 7,4 (kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová) (ICN Biochemicals) do lahvičky

obsahující 2 mg lyofilizovaného pHrodo. Suspenze byla poté 5 minut sonikována a následně ihned použita.

II. Borelie byly spočítány a potřebné množství suspenze bylo stočeno při 8000 g po dobu 15 min. Pelet borelií byl rozsuspendován v PBS s 1% BOFES (PAA-The Cell Culture Company) v poměru 1 ml PBS s 1% BOFES na 1×10^6 borelií. K naředěným boreliím bylo poté přidáno fluorescenční barvivo CFSE (Invitrogen) v poměru 1 μ l CFSE na 1ml roztoku. Následovala inkubace borelií s CFSE 15 min při pokojové teplotě ve tmě na třepačce nastavené na nízké otáčky. Po inkubaci byly obarvené borelie stočeny 15 min při 8000 g a rozsuspendovány v PBS s 1% BOFES (1×10^6 borelií v 10 μ l PBS s 1% BOFES). Takto připravené borelie byly ihned použity.

Roztok CFSE byl připraven rozpuštěním jedné lahvičky CFSE (carboxyfluorescein diacetate) zásobního roztoku v 18 μ l DMSO (dimethylsulfoxide); obojí je součástí CellTrace CFSE Cell proliferation kitu (Invitrogen). Výsledná koncentrace CFSE roztoku je 5 μ M.

3.2.3.4. Fagocytóza CFSE borelií a pHrodo kuliček

I. K aktivovaným buňkám v koncentraci 100 000 buněk ve 100 μ l na jamku bylo přidáno 100 μ l pHrodo roztoku. Buňky byly poté vráceny do termostatu a v jednotlivých intervalech byl z příslušných jamek odebrán vzorek. Odebraný roztok buněk byl přiřazen vychlazeným PBS s 1% BOFES a stočen 10 min při 150 g. Ze stočených buněk byl poté slit supernatant a pelet byl resuspendován v 300 μ l PBS s 1% BOFES. Ihned poté následovalo měření fagocytózy.

II. K aktivovaným buňkám v koncentraci 100 000 buněk ve 100 μ l na jamku bylo přidáno 10 μ l značených borelií. Výsledný poměr tak byl 10 borelií na 1 buňku. Další postup byl shodný jako při fagocytóze pHrodo partikulí.

3.2.3.5. Měření fagocytózy

Vlastní měření fagocytózy probíhalo na průtokovém cytometru BD FACSCanto II. Před každým zahájením měření fagocytózy bylo pomocí BD FACSDiva Software optimalizováno nastavení cytometru pro měřené buňky. K tomuto účelu byly zapotřebí nestimulované PMJ2-R, PMJ2-R značené F4/80 protilátkou (2 μ g/100 μ l) (e-Bioscience) a PMJ2-R značené propidium jodidem (PI) (1 μ g/ml) (Sigma). Pomocí F4/80 protilátky

značené APC bylo ověřeno, že vybrané buňky jsou skutečně makrofágy. Propidium jodidem pak byla ověřena životnost buněk.

Ke zhášení fluorescence barvených borelií, které nebyly fagocytovány, ale pouze adherovány na povrchu makrofágů, byl použit roztok ethidium bromidu (Top Bio) o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Ten byl přidán k buňkám a společně s nimi ponechán 5 min na ledu. Poté byla ihned měřena fagocytóza.

Tab. 3. Nastavení cytometru

	<i>Napětí na detektorech (V):</i>
FSC	180
SSC	330
FITC (CFSE)	360
PE (pHrodo)	350
Pe-Texas Red (PI)	450
APC (F4/80)	400
<i>Window extension</i>	7

3.2.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT

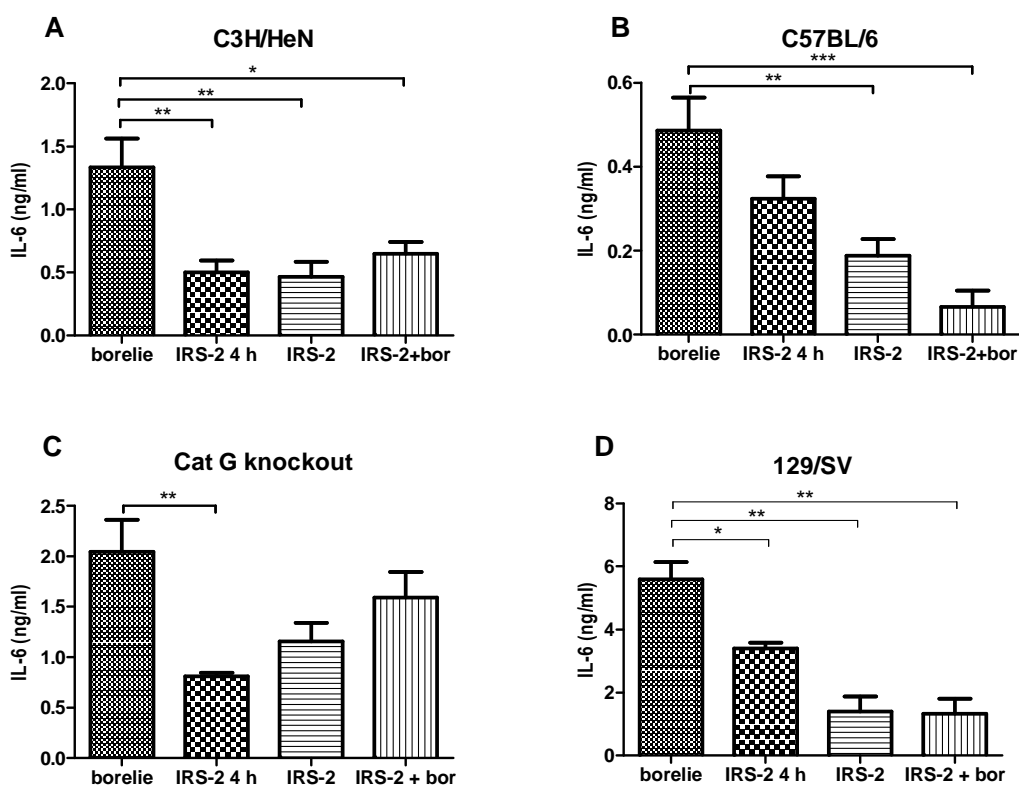
Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích. Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno v programu GraphPad Prism pomocí dvoucestné analýzy variance a Bonferroniho post-testu v případě fagocytózy a pomocí jednocestné analýzy variance a Tukeyho Post Hoc testu v případě cytokinů. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro $P < 0,05$, dvě pro $P < 0,01$, tři pro $P < 0,001$ a čtyři pro $P < 0,0001$). Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako aritmetický průměr naměřených hodnot \pm střední chyba průměru (SEM).

4. VÝSLEDKY

4.1. OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

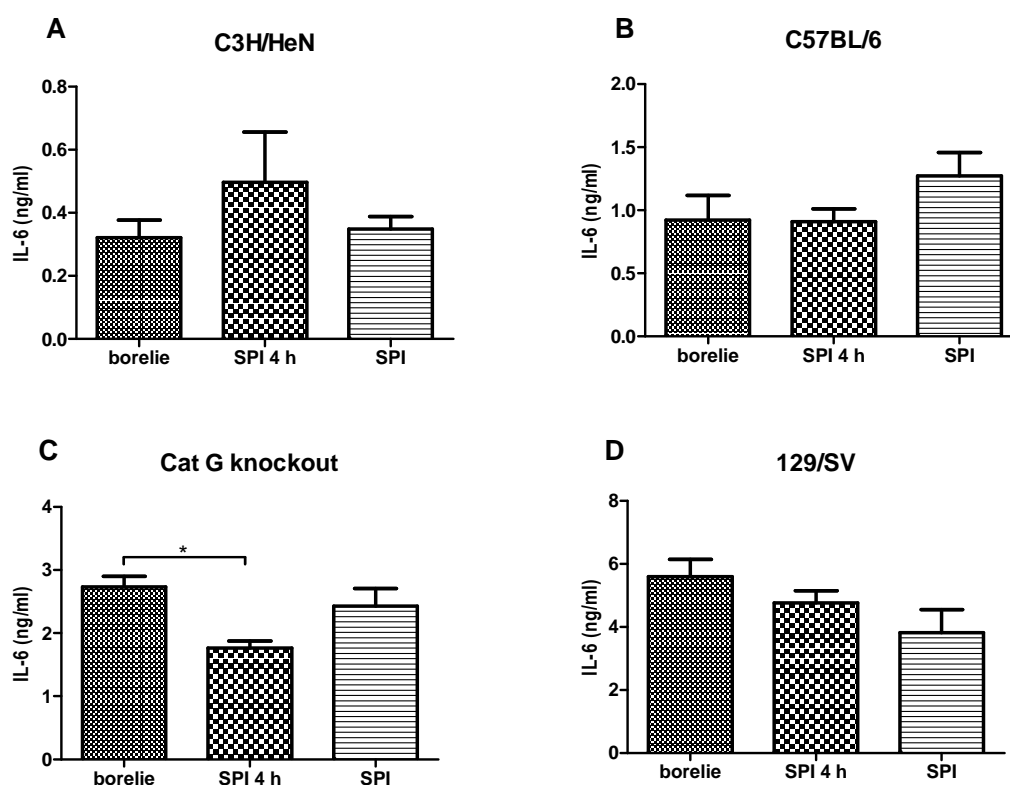
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv rekombinantních klíččících proteinů IRS-2 a SPI na produkci cytokinů IL-6, IL-10 a TNF- α dendritickými buňkami izolovanými z různých kmenů myší, které byly aktivovány boreliemi. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.1.

Graf 1 ukazuje vliv proteinu IRS-2 na produkci cytokinu IL-6 u jednotlivých myších kmenů. IRS-2 inkubovaný s DC izolovanými z C3H/HeN myší signifikantně snižoval produkci IL-6 ve všech sledovaných skupinách, a to o 50-61 % (Graf 1A). Produkce IL-6 dendritickými buňkami z C57BL/6 myší byla signifikantně snížena u skupiny buněk, kde byl IRS-2 přidán společně s boreliemi, a to o 61 %, a u skupiny, kde byl IRS-2 preinkubován s boreliemi - 86 %. Čtyřhodinová preinkubace s DC pak vedla ke snížení, které nebylo signifikantní (Graf 1B). Ke snížení produkce IL-6 vlivem IRS-2 došlo i u dalších myších kmenů. DC izolované z katepsin G knockoutů signifikantně snižovaly produkci IL-6 pod vlivem IRS-2, pokud s ním byly inkubovány 4 h před přidáním borelií, a to 2,5 \times . V ostatních skupinách došlo ke statisticky nevýznamnému snížení (Graf 1C). U kontrolní skupiny myší 129/SV došlo ke snížení produkce IL-6 ve všech skupinách, a to 1,6 \times až 4,3 \times (Graf 1D).



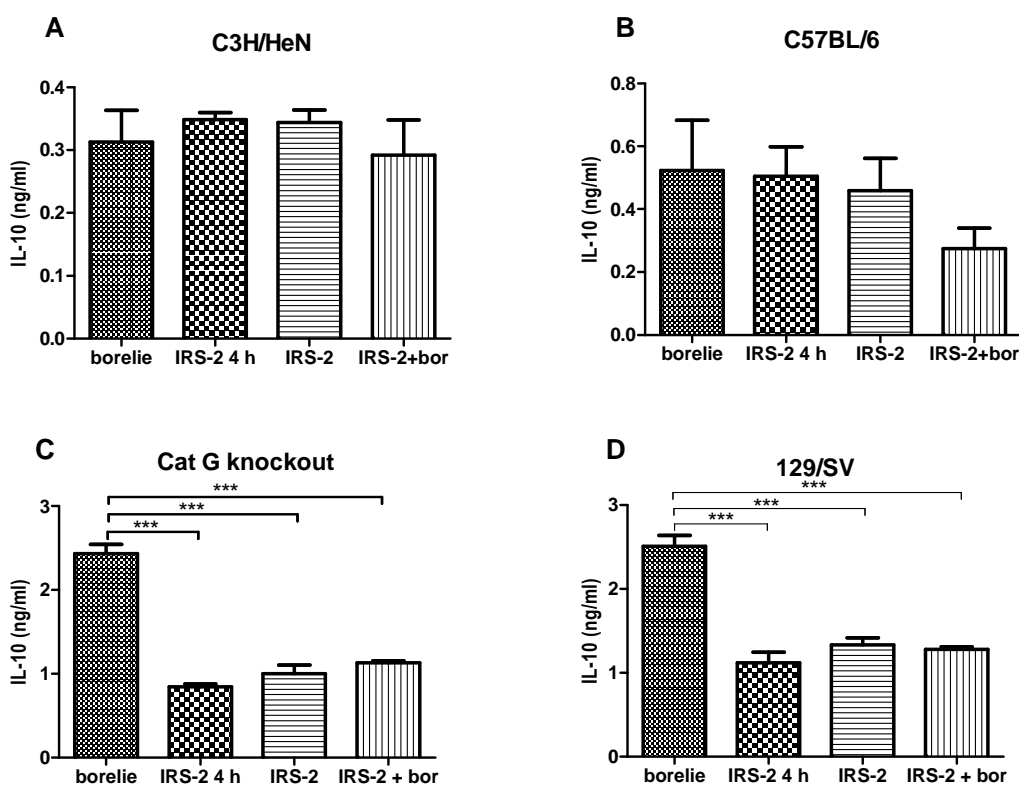
Graf 1: Vliv klíččícího rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci IL-6 dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

Vliv druhého rekombinantního proteinu, SPI, na produkci IL-6 znázorňuje Graf 2. Produkce IL-6 dendritickými buňkami ze všech kmenů myší nebyla vlivem SPI signifikantně ovlivněna. Pouze u katepsin G knockout myší došlo k signifikantnímu snížení produkce IL-6 ve skupině preinkubované 4 h s IRS-2 před přidáním borelií, a to o 35 % (Graf 2C). Stejný a však statisticky nevýznamný trend produkce IL-6 vykazovaly dendritické buňky z kmene 129/SV (Graf 2D).



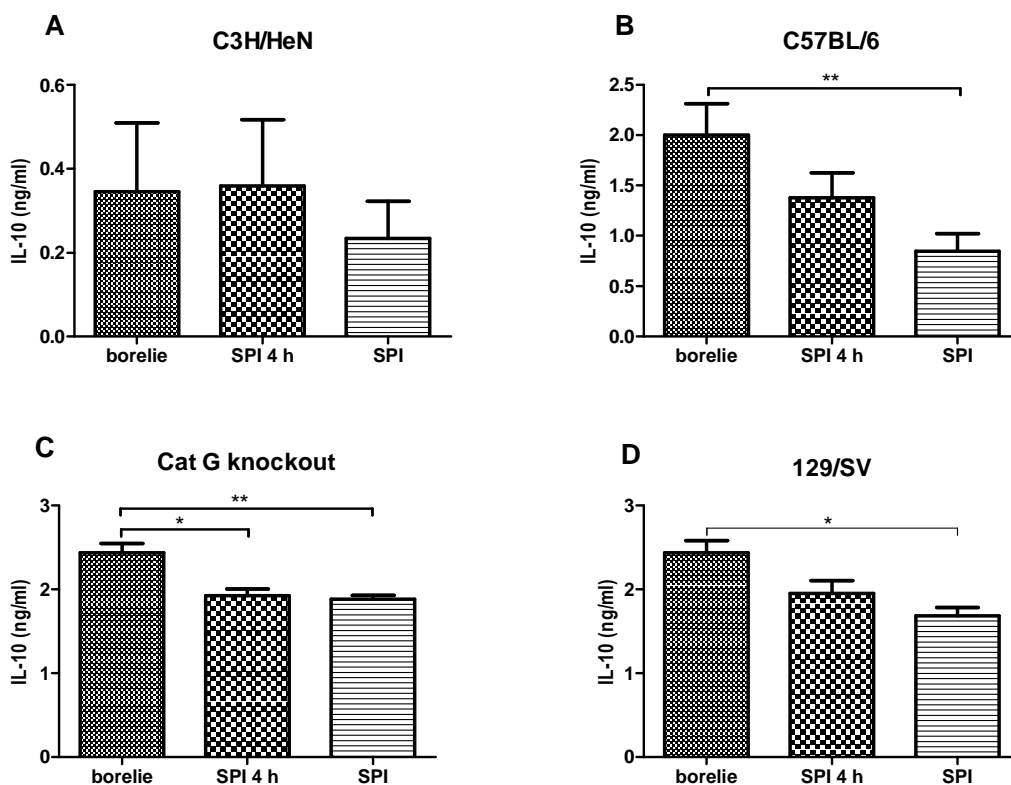
Graf 2 :Vliv klíčového rekombinantního proteinu SPI na produkci IL-6 dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

Dalším zkoumaným cytokinem v této sérii pokusů byl protizánětlivý cytokin IL-10. Ovlivnění jeho produkce rekombinantními proteiny je znázorněno v Grafu 3. Protein IRS-2 neměl významný vliv na produkci IL-10 dendritickými buňkami izolovanými z myší kmene C3H/HeN ani C57BL/6 (Graf 3A,B). Naopak u dendritických buněk z katepsin G knockout myší došlo k signifikantnímu snížení produkce IL-10 u všech tří sledovaných skupin, a to o 54 až 65% (Graf 3C). Stejně markantní snížení produkce IL-10 vlivem IRS-2 bylo pozorováno také u kmene 129/SV, konkrétně došlo u všech skupin ke snížení o 47 až 55% (Graf 3D).



Graf 3 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci IL-10 dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

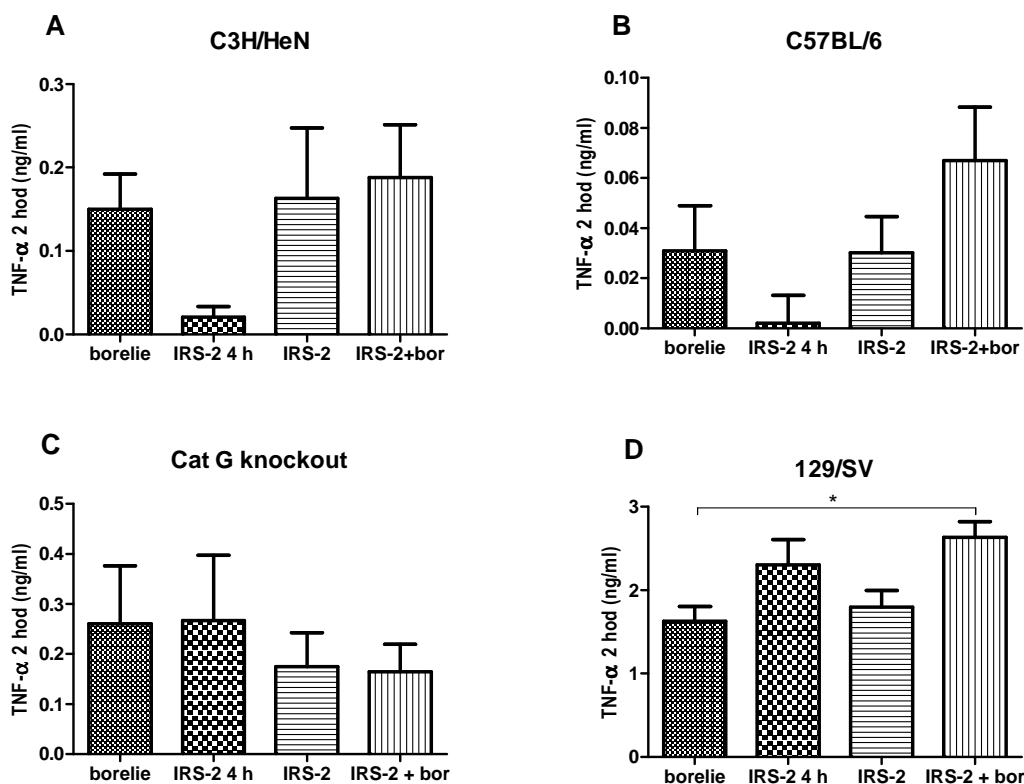
Následující Graf 4 ukazuje vliv proteinu SPI na produkci IL-10. U všech kmenů myší došlo ke snížení produkce IL-10 dendritickými buňkami ve skupině, kde SPI nebylo společně s buňkami preinkubováno. U DC z myší kmene C3H/HeN není toto snížení signifikantní (Graf 4A). U kmene C57BL/6 došlo v této skupině k signifikantnímu snížení o 57 %. Navíc u tohoto kmene bylo pozorováno i mírné snížení ve skupině se 4 h preinkubací (Graf 4B). Snížení produkce IL-10 v obou skupinách bylo pozorováno také u DC z katepsin G knockoutů. U skupiny, kde SPI nebylo před přidáním borelií s buňkami preinkubováno, se produkce IL-10 snížila o 21 % u skupiny preinkubované s SPI 4 h došlo ke snížení o 23 % (Graf 4C). Graf D znázorňuje vliv proteinu SPI na produkci IL-10 z DC myší kmene 129/SV. Pouze ve skupině, kde byl SPI přidán k buňkám zároveň s boreliemi došlo k poklesu o 31% (Graf 4D).



Graf 4 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu SPI na produkci IL-10 dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

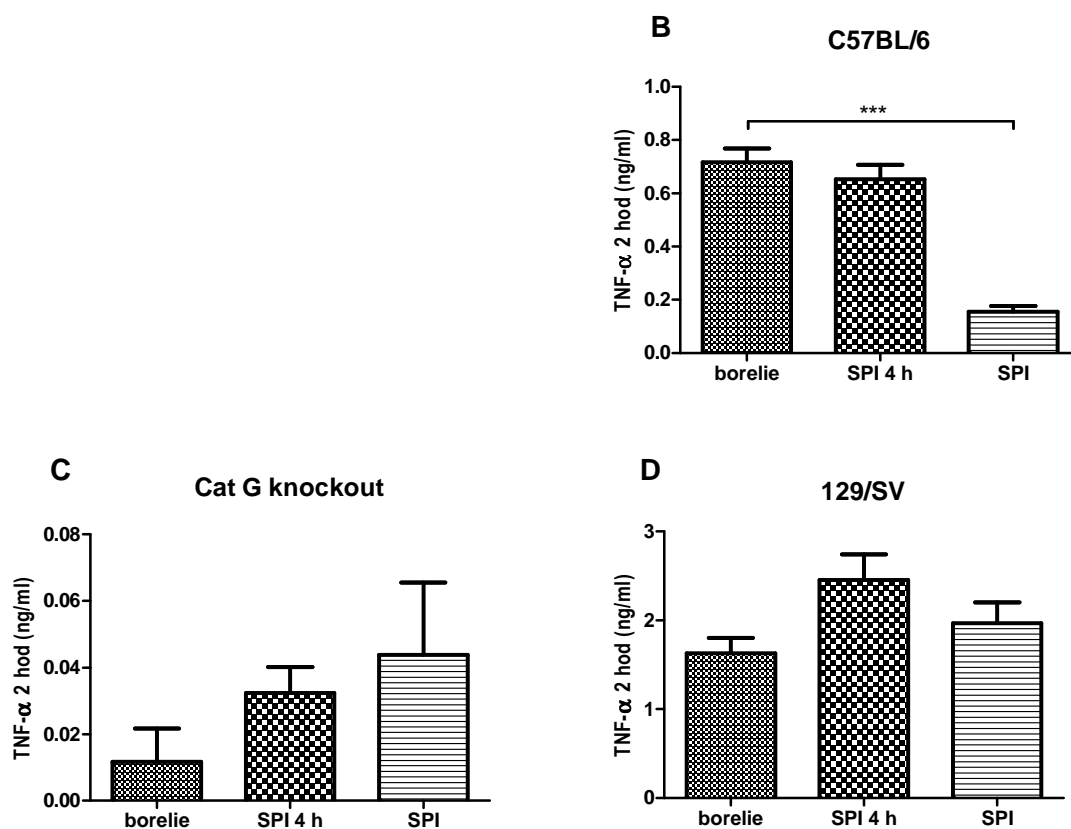
Posledním zkoumaným cytokinem byl TNF- α , vliv proteinů na produkci tohoto cytokinu byl zkoumán ve dvou časových intervalech. Jednak byl zkoumán vliv proteinů na produkci tzv. prefabrikovaného TNF- α za 2 hodiny po aktivaci buněk boreliemi a pak za 24 hod.

Vlivem rekombinantního proteinu IRS-2 došlo u DC z myší kmene C3H/HeN ke snížení produkce 2-h TNF- α ve skupině dendritických buněk preinkubovaných s IRS-2 4 h před přidáním borelií. Toto snížení však nebylo statisticky průkazné. U tohoto kmene byl dále pozorován mírný nárůst produkce 2-h TNF- α ve skupině kde byl IRS-2 před přidáním k buňkám preinkubován s boreliemi, toto zvýšení také nebylo signifikantní (Graf 5A). Téměř shodný trend vykazovaly DC z myšího kmene C57BL/6 (Graf 5B). Dendritické buňky z katepsin G knockout myší reagovaly na IRS-2 statisticky nevýznamným snížením produkce 2-h TNF- α ve dvou sledovaných skupinách (Graf 5C). U myší kmene 129/SV bylo pozorováno mírné zvýšení produkce 2-h TNF- α ve skupině preinkubované s IRS-2 4 h před přidáním borelií a ve skupině kde byl IRS-2 přidán k buňkám zároveň s boreliemi. V poslední skupině kde byl IRS-2 před přidáním k buňkám preinkubován s boreliemi došlo k signifikantnímu nárůstu produkce cytokinu o 38 % (Graf 5D).



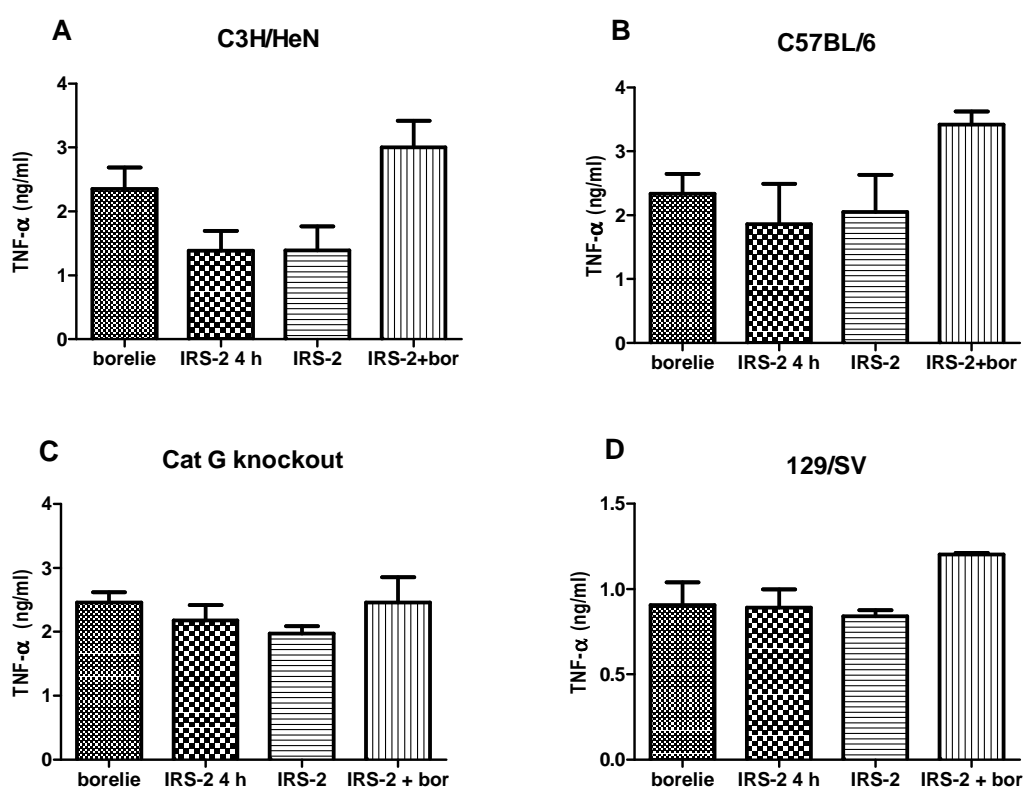
Graf 5 :Vliv klíčového rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci 2-h TNF- α dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

U druhého proteinu SPI se z technických důvodů nepodařilo zjistit jeho vliv na produkci 2-h TNF- α dendritickými buňkami z myšího kmene C3H/HeN. U DC z kmene C57BL/6 došlo vlivem SPI k signifikantnímu snížení produkce 2-h TNF- α o 78 % (Graf 6B). Buňky z katepsin G knockoutů vlivem SPI mírně zvýšily produkci 2-h TNF- α v obou sledovaných skupinách (Graf 6C). Trend zvýšení produkce 2-h TNF- α v obou skupinách byl pozorován také u DC z kmene 129/SV (Graf 6D).



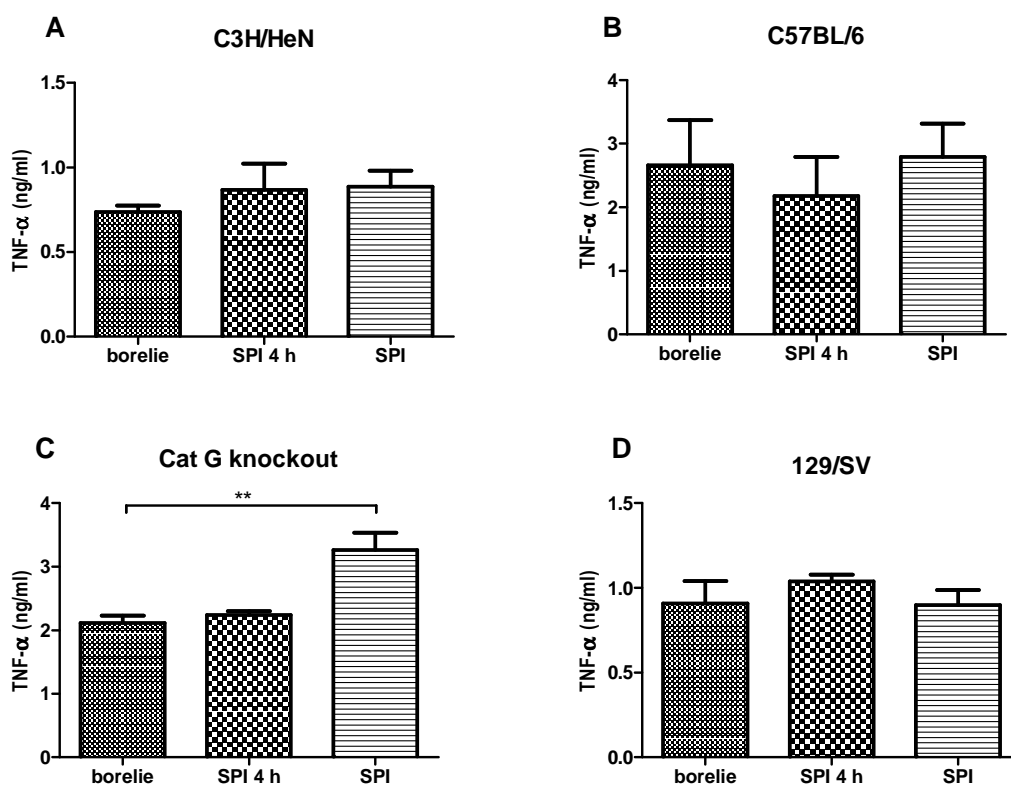
Graf 6 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu SPI na produkci 2-h TNF- α dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

Vliv obou rekombinantních proteinů na produkci 24-h TNF- α ukazují Grafy 7 a 8. DC izolované z myší kmene C3H/HeN reagovaly na inkubaci s proteinem IRS-2 mírným snížením produkce TNF- α za 24 h, a to ve skupině kde byly buňky před přidáním borelií 4 h preinkubovány s IRS-2 a ve skupině kde byl IRS-2 k buňkám přidáván zároveň s boreliemi. Naopak ve skupině kde byl IRS-2 před přidáním k buňkám preinkubován s boreliemi došlo k mírnému nárůstu produkce cytokinu (Graf 7A). Shodný trend vykazovaly v přítomnosti IRS-2 také DC z kmene C57BL/6 (Graf 7B). U DC z katepsin G knockoutů se produkce 24-h TNF- α vlivem IRS-2 v podstatě nezměnila. (Graf 7C). DC z posledního kmene myší 129/SV vykazovaly v přítomnosti IRS-2 lehce zvýšenou produkci 24-h TNF- α ve skupině kde byl IRS-2 před přidáním k buňkám preinkubován s boreliemi (Graf 7D).



Graf 7 :Vliv klíčového rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci 24-h TNF- α dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

Vlivem druhého rekombinantního proteinu SPI nebyla produkce 24-h TNF- α dendritickými buňkami z myší kmene C3H/HeN ani C57BL/6 změněna (Graf 8A, B). Buňky z katepsin G knockout myší reagovaly na přítomnost SPI signifikantním zvýšením produkce 24-h TNF- α ve skupině kde byl SPI přidán k buňkám zároveň s boreliemi, a to o 35% (Graf 8C). Produkce 24-h TNF- α dendritickými buňkami z kmene 129/SV nebyla vlivem SPI výrazně ovlivněna (Graf 8D).

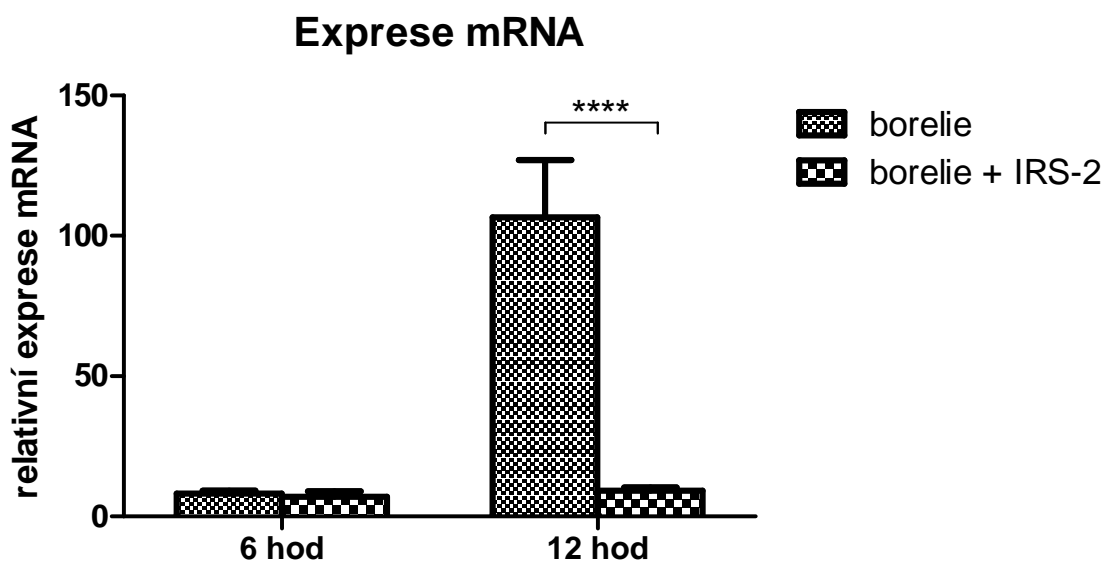


Graf 8 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu SPI na produkci 24-h TNF- α dendritickými buňkami izolovanými z myšího kmene C3H/HeN (A), C57BL/6 (B), katepsin G knockout (C) a 129/SV (D)

4.2. STANOVENÍ ÚROVNĚ OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINU DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda inhibiční efekt rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci IL-6 dendritickými buňkami je pozorovatelný již na úrovni mRNA. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.2.

Vlivem IRS-2 došlo k 11násobnému snížení exprese mRNA pro IL-6 u dendritických buněk, které byly inkubovány 12 h s IRS-2. Po 6 h inkubaci tento efekt nebyl pozorován (Graf 9).



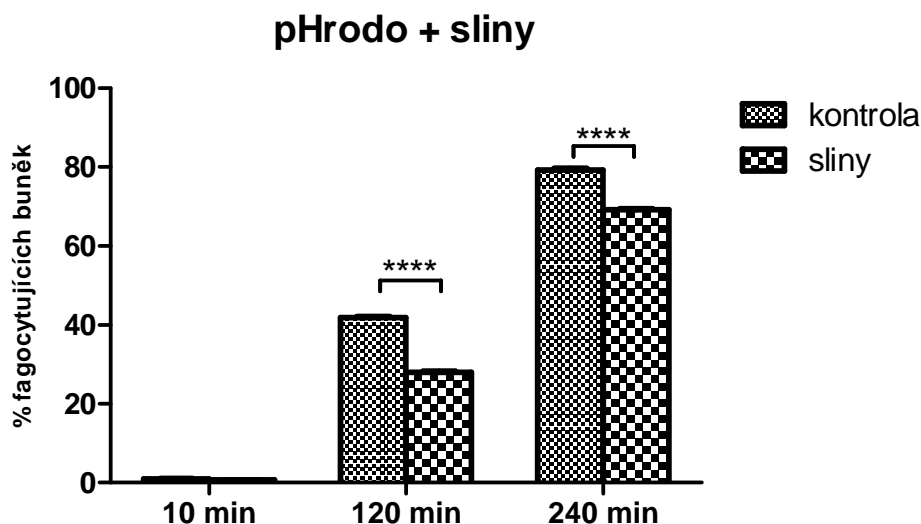
Graf 9 : Vliv rekombinantního proteinu IRS-2 na úroveň exprese mRNA pro IL-6

4.3. OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY MAKROFÁGŮ

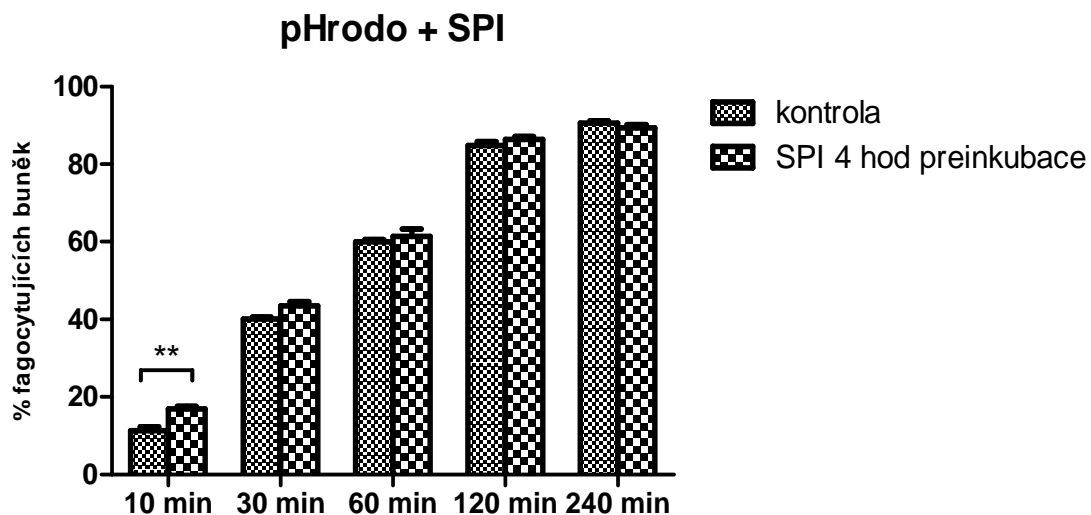
V tomto pokuse byl zkoumán vliv slin a rekombinantních klíčtčích proteinů IRS-2 a SPI na fagocytózu borelií a pHrodo kuliček liniovými makrofágy PMJ2-R. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.3.

Vliv klíčtčích slin na fagocytózu pHrodo kuliček makrofágy zobrazuje Graf 10. Inkubace makrofágů se slinami vedla k signifikantnímu snížení fagocytózy v časovém intervalu 120 min, a to ze 42% na 28%; v intervalu 240 min pak došlo ke snížení fagocytózy z 81% na 67%.

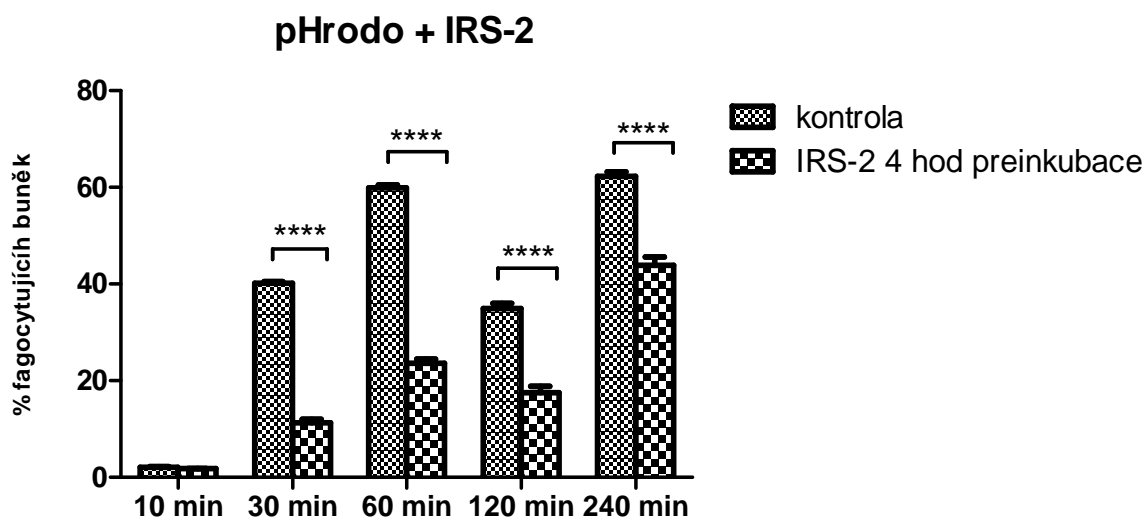
Vliv proteinů na fagocytózu pHrodo kuliček ukazují Grafy 11 a 12. Inkubace makrofágů s SPI proteinem vedla k signifikantnímu zvýšení fagocytózy pouze v časovém intervalu 10 minut, a to z 11% na 17%. V ostatních intervalech není žádná změna (Graf 11). Naopak inkubace makrofágů s proteinem IRS-2 vedla k výraznému snížení fluorescenčního signálu ve všech časových intervalech kromě časového intervalu 10 min. Konkrétně v intervalu 30 min došlo ke snížení fluorescence ze 40% na 11%, po 60 min z 60% na 24%, po 120 min z 35% na 18% a po 240 min došlo ke snížení fluorescence z 62% na 43%. Procentuální nejednotnost v časových intervalech tohoto pokusu je dána samostatnými měřeními časových intervalů 30 min a 60 min, které tak procentuálně nenavazují na intervaly 120 min a 240 min (Graf 12).



Graf 10 : Vliv klíčtčích slin na % makrofágů fagocytujících pHrodo kuličky

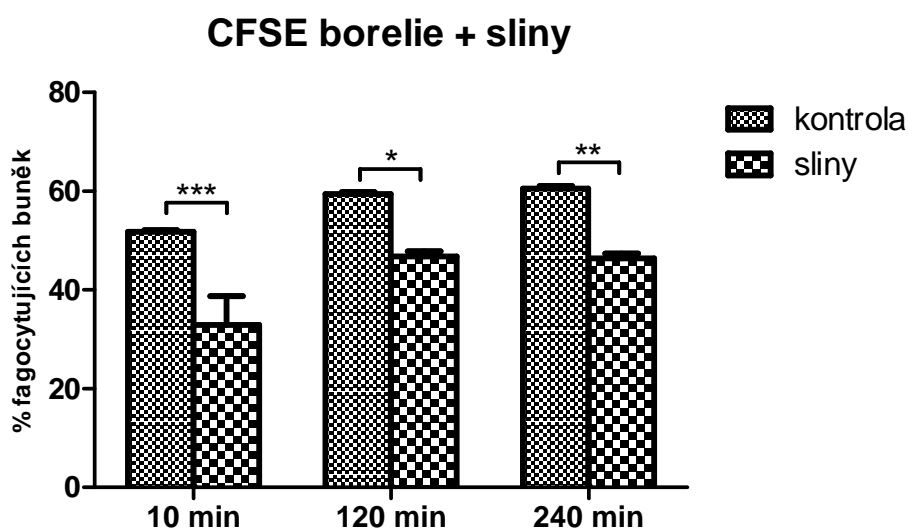


Graf 11 : Vliv klíštěcího rekombinantního proteinu IRS-2 na % makrofágů fagocytujících pHrodo kuličky

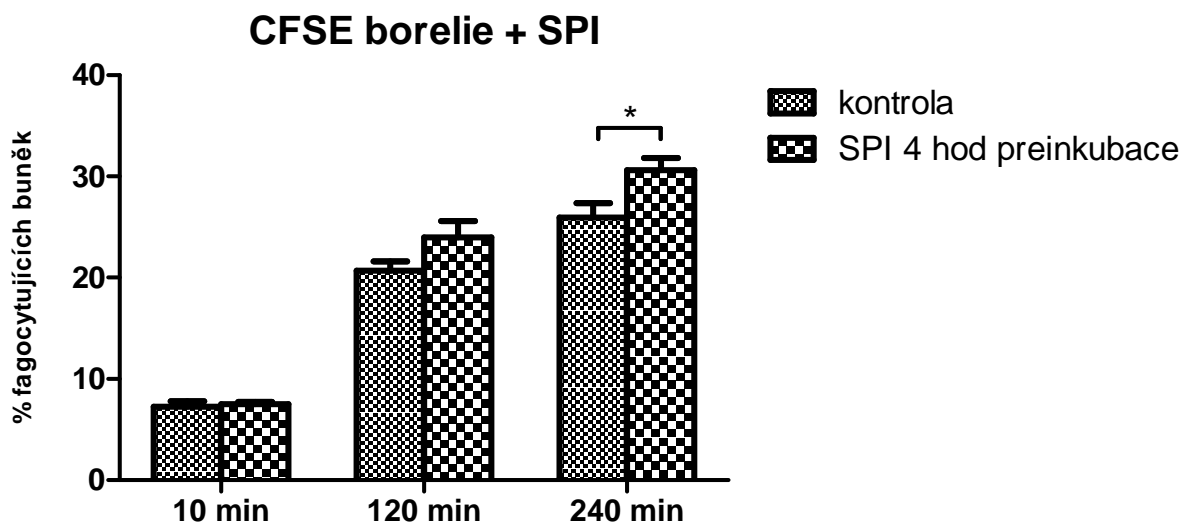


Graf 12 : Vliv klíštěcího rekombinantního proteinu IRS-2 na % makrofágů fagocytujících pHrodo kuličky

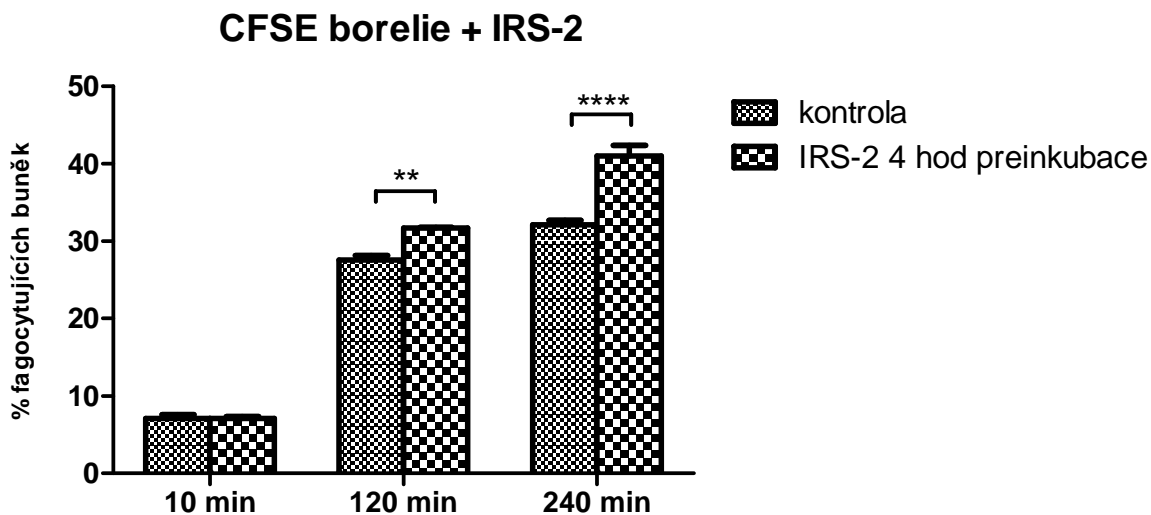
Ovlivnění fagocytózy CFSE značených borelií ukazují Grafy 13, 14 a 15. Inkubace makrofágů s klíštěcími slinami vedla ke snížení fagocytózy ve všech časových intervalech. V intervalu 10 min došlo ke snížení z 52% na 33%, v intervalu 120 min ke snížení ze 59% na 47% a v intervalu 240 min ze 60% na 46% (Graf 13). Po inkubaci makrofágů s proteinem SPI došlo k mírnému nárůstu fagocytózy borelií v časových intervalech 120 min a 240 min. Avšak pouze v intervalu 240 min je toto zvýšení statisticky významné, a to z 26 % na 31 % (Graf 14). Inkubace makrofágů s proteinem IRS-2 vedla k signifikantnímu zvýšení fluorescence pohlcených borelií jak v intervalu 120 min, tak i v intervalu 240 min. Po 120 min byla fluorescence pohlcených borelií zvýšena z 27 na 32 % a po 240 min z 32 % na 41 % (Graf 15).



Graf 13 : Vliv klíštěcích slin na % makrofágů fagocytujících CFSE značené borelie



Graf 14 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu SPI na % makrofágů fagocytujících CFSE značené borelie



Graf 15 : Vliv klíčového rekombinantního proteinu IRS-2 na % makrofágů fagocytujících CFSE značené borelie

5. DISKUSE

Lymeská borelióza patří v současnosti mezi nejrozšířenější členovci přenášené onemocnění v Evropě a USA. V posledních letech je nejen v České republice zaznamenáván zvýšený počet osob, které se tímto onemocněním nakazí. Vzhledem k závažnosti této choroby je vyvíjena velká snaha o nalezení vhodných proteinů, které by napomohly ve vývoji účinné vakcíny proti tomuto onemocnění. V této souvislosti byla v posledních letech připravena řada rekombinantních proteinů z klíštěcích slin. Právě postupné zjišťování funkcí těchto proteinů a jejich porozumění v komplexním měřítku může být klíčem ve vývoji nových látek účinných proti lymeské borelióze, ale i jiným onemocněním.

Hlavním úkolem mé diplomové práce bylo zjistit vliv dvou rekombinantních proteinů na buňky přirozené imunity, především dendritické buňky a makrofágy, které hrají zásadní roli v započetí imunitní reakce. Téma mé práce bylo navrženo na základě předchozího výzkumu Martiny Slámové, která dosáhla zajímavých výsledků při studiu vlivu klíštěcích slin na funkci dendritických buněk (Slámová et al. 2011). Toto téma pak bylo následně rozvedeno a zaměřeno na dva nové proteiny z klíštěcích slin, které jsme měli v laboratoři k dispozici.

5.1. OVLIVNĚNÍ PRODUKCE CYTOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

V první části své diplomové práce jsem se zaměřila na vliv obou proteinů na produkci cytokinů dendritickými buňkami z různých kmenů myši. Oba dva sledované proteiny jsou inhibitory serinových proteáz, konkrétně pak katepsinu G a chymázy v případě IRS-2 a katepsinu G, elastázy a myši proteinázy 3 u SPI. Jelikož inhibice katepsinu G je společnou vlastností obou testovaných proteinů, byly v pokusech jako zdroj dendritických buněk použity také katepsin G „knockout“ myši. Bylo popsáno, že se katepsin G kromě granulí neutrofilů nachází také v myeloidních a plasmacytoidních dendritických buňkách člověka. Zde hraje důležitou roli při zpracování antigenu pro MHCII prezentaci, a tím ovlivňuje aktivaci CD4+ T-lymfocytů. Přítomnost katepsinu G byla potvrzena také u myších slezinných dendritických buněk, bohužel dosud neexistují publikace, které by se blíže zabývaly výzkumem katepsinu G v myších DC (Burster et al. 2004, 2005, 2010, Stoeckle et al. 2009).

Naše výsledky ukazují, že ovlivnění produkce cytokinů oběma proteiny je prakticky nezávislé na jejich inhibiční aktivitě vůči katepsinu G (tj. buňky z katepsin G KO myši a jejich mateřský kmen stejného genetického pozadí 129/SV). Podobný efekt byl prokázán také u prvního serpinu Iris z *Ixodes ricinus*. Ukázalo se, že inhibiční aktivita tohoto proteinu

na produkci TNF- α aktivovanými monocyty je nezávislá na jeho reaktivní centrální smyčce a antiproteázové aktivitě, ale že jsou za ni zodpovědné tzv. „exosites“, které zřejmě zprostředkovávají přímou vazbu Iris s monocyty (Prevot et al. 2009).

Z našich výsledků je zřejmé, že nejvýraznější a nejkompexnější je snížení produkce IL-6 vlivem rekombinantního proteinu IRS-2. Vlivem tohoto proteinu došlo k signifikatnímu či alespoň trendovému snížení produkce IL-6 u všech kmenů myší. Tento výsledek koresponduje s výsledky Hoviuse a kol. Ti prokázali, že protein Salp15 se váže na receptor DC-SIGN na povrchu dendritických buněk a tím spouští signální kaskádu vedoucí ke snížené produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12p70 a TNF- α . Zároveň však poukazují na to, že přidáním polyklonálních anti-Salp15 protilátek se nepodařilo zvrátit efekt klíštěcích slin na inhibici IL-6 a TNF- α a že tento efekt může být způsoben vlivem také jiných molekul přítomných ve slinách (Hovius et al. 2008). Autoři jako příklad uvádí další protein z klíštěcích slin prostaglandin E2, který mimo jiné rovněž inhibuje IL-12 a TNF- α (Sá-Nunes et al. 2007). Lze spekulovat, že proteinem zodpovědným za inhibici IL-6 pozorovanou Hoviušem a kol. ve slinách *Ixodes scapularis* by mohl být protein homologní či příbuzný IRS-2. Kvůli komplexnímu vlivu IRS-2 na snížení produkce IL-6 jsme se rozhodli zjistit, na jaké úrovni k této inhibici dochází. Pomocí RT-PCR jsme došli ke zjištění, že IRS-2 výrazně snižuje relativní expresi mRNA pro IL-6. Podobného výsledku dosáhli opět Hovius a kol., kteří zjistili, že snížená produkce IL-6 a TNF- α vlivem Salp15 je důsledkem destabilizace mRNA pro tyto cytokiny v přítomnosti Salp15 (Hovius et al. 2008). Potlačení produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α dendritickými buňkami aktivovanými *B. afzelii* pod vlivem slin z *Ixodes ricinus* pozorovala také Martina Slámová, na jejíž práci sem navazovala (Slámová et al. 2011). Opět lze spekulovat, že efekt slin *Ixodes ricinus* na snížení produkce IL-6 dendritickými buňkami, který pozorovala Martina, může být (alespoň částečně) přičítán IRS-2. Během našich pokusů se však nepotvrdilo, že by se IRS-2 či SPI výrazně podílely na snížení produkce TNF- α , které je pozorováno pod vlivem slin. Vlivem SPI sice došlo u myší kmene C57BL/6 ke snížení produkce 2-h TNF- α v jedné skupině, avšak tento trend se u ostatních kmenů myší nepotvrdil. Naopak pod vlivem SPI byl u katepsin G knockout myší pozorován nárůst produkce 24-h TNF- α o 35 % u skupiny bez preinkubace. Tyto knockout myši však mohou mít změněné imunitní reakce, důsledkem čehož je rozdílné chování SPI v katepsin G knockout myších oproti ostatním kmenům. MacIvor a spol. sice udávají, že katepsin G knockout myši mají normálně funkční neutrofilů, avšak o fenotypu dendritických buněk tohoto kmene nejsou dosud žádné relevantní informace (MacIvor et al. 1999).

Zajímavé výsledky, které podporují předchozí práci Martiny, byly získány sledováním vlivu IRS-2 a SPI na produkci IL-10 dendritickými buňkami. Ukázalo se, že vlivem proteinu SPI došlo u dendritických buněk k signifikantnímu snížení produkce IL-10 u tří ze čtyř sledovaných kmenů myši. Protein IRS-2 pak velmi výrazně snižoval produkci IL-10 u katepsin G knockout myši a u myši kmene 129/SV, zatímco u myši kmene C3H/HeN a C57BL/6 k snížení nedošlo. Tyto rozdílné výsledky by mohly být vysvětleny odlišným genetickým pozadím a imunitní odpovědí 129/SV a tedy i katepsin G knockout myši. Např. Asselin-Paturelová a kol. uvádí, že ve slezině myši kmene 129/SV je v porovnání s ostatními myšimi kmeny výrazně vyšší podíl plazmacytoidních dendritických buněk. Tyto pDC se od konvenčních dendritických buněk liší například nižší expresí CD11c či MHCII molekul a naopak zvýšenou produkcí IFN- α (Asselin-Paturel et al. 2003). Nicméně pokusy s oběma proteiny potvrdily práci Martiny, která prokázala, že sliny z *Ixodes ricinus* snižují produkci IL-10 dendritickými buňkami aktivovanými boreliemi (Slámová et al. 2011). Potlačení produkce IL-10 vlivem SGE bylo pozorováno také u myších splenocytů aktivovaných mitogenem (Hannier et al. 2003). Tyto výsledky jsou však v ostrém kontrastu s předchozím zkoumáním klíštěcích slin, které ukázalo, že obecně vlivem slin dochází k potlačení Th1 či Th17 odpovědi a polarizaci směrem k Th2 imunitní odpovědi (Kopecký et al. 1999; Skallová et al. 2008; Ferreira a Silva 1999).

V rámci své práce jsem se snažila také zjistit ovlivnění produkce IL-12 dendritickými buňkami. Bohužel se nám však nepodařilo indukovat měřitelné množství IL-12. Tento fakt může být zapříčiněn použitím ELISA kitu detekujícího IL-12p70. Pro vytvoření tohoto heterodimeru sestávajícího z podjednotek p35 a p40 je totiž zapotřebí kostimulační signál, který v našem pokusu chyběl (Schulz et al. 2000, Snijders et al. 1998).

5.2. OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY MAKROFÁGŮ

5.2.1. OPTIMALIZACE METODY

Součástí mé práce byla také optimalizace měření fagocytózy pomocí průtokové cytometrie. Martina Slámová, na jejíž práci jsem navazovala i v této části, sledovala fagocytózu borelií dendritickými buňkami pomocí nepřímé fluorescence (Slámová et al. 2011). Avšak z důvodu značných limitů této metody a její nepřilíživé přesnosti jsme se rozhodli pro stanovování fagocytózy právě pomocí průtokového cytometru. Tato metoda se v naší laboratoři dosud neprováděla, a tak bylo před vlastním měřením fagocytózy zapotřebí najít a zajistit optimální podmínky, které by zaručovaly přesnost a spolehlivost metody a zároveň jasnou interpretaci získaných výsledků.

Po prvotních pokusech jsme zjistili, že pro zavedení této metody jsou nejvhodnější liniové makrofágy PMJ2-R, s kterými se velmi dobře pracuje. Výhodou těchto buněk je jejich nepřilnavost k povrchu kultivační destičky, která zaručuje snadnou manipulaci s těmito buňkami, respektive jejich odebrání a následně jejich dobrou kvalitu během stanovování (Obr. 7).

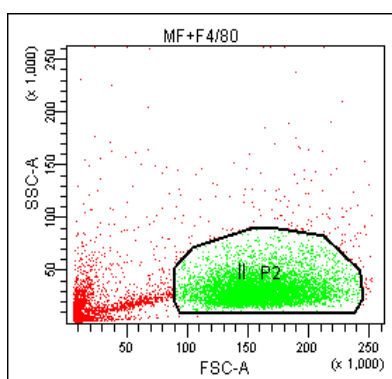
V další fázi bylo třeba překonat problém se samotným stanovením fagocytózy. Výsledky, které jsme získali během počátečních měření fagocytózy borelií značených pomocí CFSE, byly nejasné a nedařilo se nám rozlišit borelie pohlcené makrofágy a borelie, které byly na buňkách pouze adherované. Z tohoto důvodu jsme hledali jiný systém, který by pomohl tento problém překonat. Nakonec jsme použili nedávno vyvinuté částice konjugované s novým fluorescenčním barvivem pHrodo (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/P35361>). Fluorescence tohoto speciálně vyvinutého barviva se zvyšuje spolu s klesajícím pH uvnitř fagozomu. Při měření v průtokovém cytometru jsou tedy vidět pouze částice pohlcené buňkou a nikoli navázané na jejím povrchu. Tyto částice jsou tedy velmi vhodným modelem pro studium fagocytózy makrofágy. Avšak ukázalo se, že i tyto konjugáty mají své limity. Pomocí pHrodo konjugátů nelze stanovovat fagocytózu dendritických buněk a neutrofilů, jelikož fagozomální pH těchto buněk není na rozdíl od makrofágů kyselé (Savina a Amigorena 2007, Lee et al. 2003).

Po provedení série experimentů s fagocytózou pHrodo partikulí jsme se rozhodli vrátit se zpět k fagocytóze borelií. Pro sledování fagocytózy těchto mikrobů jsme používali jejich značení pomocí CFSE (Tuominen-Gustafsson et al. 2006). Opět však vyvstal problém s odlišením borelií pohlcených a navázaných. Ve většině publikací se pro odlišení používá tzv. zhášení externí fluorescence nalepených borelií (bakterií) pomocí Trypanové modři (Hed et al. 1987, Al-Robaiy et al. 2005, Sun et al. 2005). Vyzkoušeli jsme proto různé modifikace této metody. Používali jsme různé koncentrace Trypanové modře a inkubovali je s buňkami různě dlouhou dobu. Avšak nikdy se nám nepodařilo prokazatelně zhasnout fluorescenci adherovaných borelií. Další metoda, kterou jsme vyzkoušeli pro odlišení adherovaných borelií, bylo použití cytochalasinu B (Peng et al. 2010). Cytochalasin B je mykotoxin, který inhibuje polymerizaci aktinu. Po jeho přidání k buňkám by tedy nemělo dojít k fagocytóze. Měřila jsem tedy dvě paralelní skupiny buněk, jednu skupinu buněk bez Cytochalasinu B, kde byly detekovány jak borelie fagocytované, tak navázané na povrchu buňky a druhou s Cytochalasinem, kde měly být pouze borelie navázané na buňky. Ani tato metoda však nefungovala dle očekávání. Úspěšná se nakonec ukázala až metoda zhášení vnější fluorescence pomocí etidium bromidu EtBr (Fattorossi et al. 1989). EtBr překryje

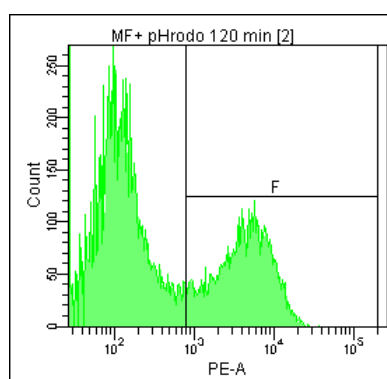
fluorescenci CFSE mechanismem zvaným FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Heinzelmann et al. 1997).

Navzdory zvládnuté metodice a úspěšnému zhášení vnější fluorescence nevytvářela fluorescence fagocytovaných borelií zřetelně oddělený signál jako tomu je u pohlcených pHrodo kuliček (Obr. 8, Obr. 9). Zjistili jsme, že tento fakt je zapříčiněn pH senzitivitou fluoresceinu, který je složkou CFSE. Fluorescein má v podstatě opačnou vlastnost jako pHrodo, a sice že s klesajícím pH jeho fluorescence slábne (Savina et al. 2006). CFSE je tedy na rozdíl od pHrodo vhodný pro měření fagocytózy neutrofilů a dendritických buněk. Jeho použití pro měření fagocytózy makrofágů není vyloučené, avšak není ani zcela ideální.

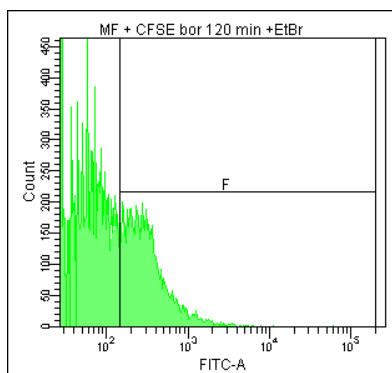
Po zjištění tohoto faktu jsme se rozhodli vrátit se k původnímu záměru a změřit fagocytózu značených borelií dendritickými buňkami. Pro tento pokus jsme použili dendritické buňky izolované předchozí den ze sleziny, avšak tyto buňky nebyly schopny fagocytovat (Obr. 10). Tento fakt může být zapříčiněn mnoha okolnostmi. Dendritické buňky se mohou aktivovat při samotné izolaci pomocí magnetické separace CD11c kuličkami (Zarnani et al. 2006). Zralé buňky pak již nejsou schopny fagocytózy. Kromě toho se uvádí, že již krátkodobá kultivace vyizolovaných dendritických buněk vede k jejich spontánní aktivaci (Schlecht et al. 2006, Zarnani et al. 2006). Dendritické buňky vyizolované tímto způsobem se tedy ukázaly jako nevhodné pro studium fagocytózy. Pro tyto účely by bylo vhodné použít dendritické buňky izolované z kostní dřeně.



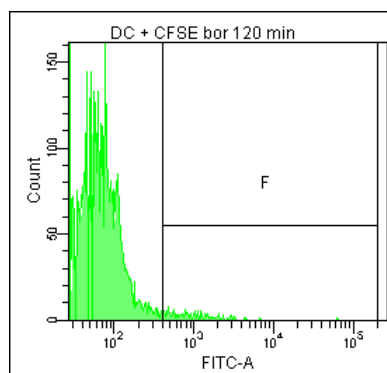
Obr. 7 : Populace liniových makrofágů PMJ2-R



Obr. 8 : PMJ2-R makrofágy inkubované 120 min s pHrodo. F- populace fagocytujících buněk



Obr. 9 : PMJ2-R makrofágy inkubované 120 min s CFSE boreliemi. F- populace fagocytujících buněk



Obr. 10 : Slezinné DC inkubované 120 min s CFSE boreliemi. F- populace fagocytujících buněk

5.2.2. OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY MAKROFÁGŮ

Během této série pokusů jsme zkoumali, jaký vliv mají sledované proteiny, ale i klíštěcí sliny na fagocytární schopnost makrofágů. V pokusech s klíštěcími slinami z *Ixodes ricinus* se potvrdily předchozí výsledky získané v naší laboratoři. V našich pokusech snižovaly sliny fagocytózu jak pHrodo kuliček, tak i CFSE značených borelií. Také Kuthejlová a Kopecký ukázali, že vlivem SGE z *I. ricinus* dochází ke zhoršení schopnosti makrofágů pohlcovat spirochety a následně je zabít (Kuthejlová a Kopecký 2001). Stejného výsledku dosáhli i Kýčková a spol., kteří též potvrdili inhibiční vliv slin na množství fagocytujících makrofágů, ale i pohlcených bakterií (Kýčková et al. 2006). V dalším článku byl popsán inhibiční vliv slin z *D. variabilis* na fagocytózu zymozanových částic liniovými makrofágy. Sliny měly opět vliv jak na počet fagocytujících buněk, tak i na množství pohlcených částic (Kramer et al. 2011). Tento prokázaný inhibiční vliv slin by mohl být částečně způsoben přítomností proteinu IRS-2. Během našich pokusů se ukázalo, že tento protein velmi výrazně snižuje fluorescenční signál pocházející z pohlcených pHrodo částic. Zdánlivě opačný efekt má tento protein na fagocytované borelie značené CFSE. Domníváme se, že tento na první pohled protichůdný efekt by mohl být zapříčiněn změnou pH uvnitř fagozomu v přítomnosti IRS-2. Jestliže pHrodo partikule reagují na snižující se pH uvnitř fagozomu nárůstem fluorescence, pak by snížený signál pozorovaný během tohoto pokusu mohl znamenat spíše vyšší pH oproti kontrole než menší množství pohlcených borelií. Tento efekt pak může vysvětlit opačné výsledky získané při měření fagocytózy CFSE borelií. Jak je uvedeno výše, fluorescein obsažený v CFSE je pH senzitivní, tudíž vyšší signál v tomto pokusu by byl důsledkem právě zmiňovaného zvýšení pH oproti kontrole. Znamenalo by to tedy, že IRS-2 neovlivňuje fagocytózu ve smyslu pohlcování cizorodých agens, ale postihuje

zřejmě jen schopnost makrofágů degradovat fagocytovaný materiál. Tato teorie by však měla být dále ověřena.

Martina Slámová, na kterou jsem navazovala, se naopak zabývala vlivem slin na fagocytózu dendritických buněk. Ve svých pokusech prokázala, že klíštěcí sliny mají výrazný inhibiční efekt také na fagocytární schopnost dendritických buněk (Slámová et al. 2011). Tento pokus se nám bohužel nepodařilo z důvodů uvedených výše zopakovat, nemohu proto tyto výsledky nijak potvrdit či vyvrátit.

Další autoři ukázali, že kromě makrofágů a dendritických buněk mají sliny vliv také na inhibici fagocytózy a zabíjení spirochet *Borrelia burgdorferi* neutrofily (Ribeiro et al. 1990, Montgomery et al. 2004). Problematika vlivu klíštěcích proteinů na neutrofily bude proto v blízké budoucnosti předmětem dalších experimentů.

6. ZÁVĚR

- **serpin IRS-2 vykazuje inhibiční efekt na produkci IL-6 dendritickými buňkami ze všech kmenů myší**
- **serpin IRS-2 vykazuje inhibiční efekt na produkci IL-10 některými kmeny myší**
- **protein SPI vykazuje inhibiční efekt na produkci IL-10 třemi myšími kmeny**
- **byla optimalizována metoda pro stanovení fagocytózy pomocí průtokového cytometru**
- **byl potvrzen vliv slin z *I. ricinus* na snížení fagocytární schopnosti makrofágů**
- **serpin IRS-2 zřejmě snižuje schopnost makrofágů degradovat pohlcený materiál**

7. SEZNAM ZKRATEK

ADO	adenosin
ADP	adenosin difosfát
AMP	adenosin monofosfát
APC	antigen presenting cell, antigen prezentující buňka
ATP	adenosin trifosfát
<i>B.b.s.l.</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
<i>B.b.s.s.</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
Bgp	glycosaminoglycan-binding protein, glykosaminoglykan vázající protein
BOFES	bovinní fetální sérum
Bp	párů bází
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly-H
cAMP-PKA	cyclic adenosine monophosphate - protein kinase A
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein diacetate
CRASP	complement regulator-acquiring surface protein
CTL	cytotoxické T- lymfocyty
Dbp A, B	decorin binfing protein, dekorin vázající protein A, B
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DTH	delayed type hypersensitivity, senzitivita oddáleného typu
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EM	erythema migrans
Erp	OspE/F related protein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HLE	human leukocyte elastase, lidská leukocytová elastáza
IFN	interferon
IL	interleukin

IRS-2	<i>Ixodes ricinus</i> serpin 2
KO	knockout
LPS	lipopolysacharid
LTA	lipoteichoic acid, lipoteichoová kyselina
MAC	membrane attack komplex, membrány atakující komplex
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MHC	major histocompatible komplex, hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina
NK	natural killer, přirozený zabiják
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain, nukleotidy vázající oligomerizační doména
Osp A, C	outer surface protein A, C, vnější povrchový protein A, C
PAMP	pathogen associated molecular patterns , s patogeny asociované molekulární vzory
PBS	phosphate-buffered saline, fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PGE2	prostaglandin E2
PRR	pattern recognition receptor, vzory rozpoznávající receptor
RCL	reactive center loop, reaktivní centrální smyčka
RICK	receptor-interacting serine/threonine kinase
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell park memorial institute
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
SGE	salivary gland extract, extrakt ze slinných žláz
SPI	serine protease inhibitor, inhibitor serinových proteáz
STAT-1	signal transducer and activator of transcription 1
TCR	T-cell receptor, T-buněčný receptor
TGF- β	transforming growth factor
Th	T helper cell, pomocný T lymfocyt
TLR	Toll like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
t-PA	tissue plasminogen activator, tkáňový plasminogen aktivátor
TROSPA	tick receptor for OspA, klíčtčící receptor pro OspA
Vls	variable major protein-like sequence

8. CITOVANÁ LITERATURA

- Aderem, A., Underhill, D.M.** (1999): Mechanism of phagocytosis in macrophages; *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.** (2006): Pathogen recognition and innate immunity; *Cell* 124, 783-801
- Allen, J.R.** (1973): Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs; *Int. J. Parasitol.* 3, 195-200
- Al-Robaiy, S., Knauer, J., Straubinger, R.K.** (2005): *Borrelia burgdorferi* organisms lacking plasmids 25 and 28-1 are internalized by human blood phagocytes at a rate identical to that of the wild-type strain; *Infect. Immun.* 73, 5547-5553
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A.** (2008): Biology of ticks; *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 22, 195-215
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W., Das, S., Thomas, V., Persinski R., Conze, D., Askenase, P., Rincón, M., Kantor, F.** (2002): Salp 15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation; *Immunol.* 16, 849-859
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Brière, F., Trinchieri, G.** (2003): Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody; *J. Immunol.* 171, 6466-77
- Banchereau, J., Steinman, R.M.** (1998): Dendritic cells and the control of immunity; *Nature* 392, 245-252
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A.** (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 378-383
- Barbour, A.G., Hayes, S.F.** (1986): Biology of *Borrelia* species; *Microbiol. Rev.* 50, 381-400
- Bartůňek, P. a kol.** (2006): Lymeská borrelióza, 3. Vydání, Praha: Grada Publishing
- Bergman, D. K.** (1996): Mouthparts and feeding mechanisms of haematophagous arthropods. In S. K.Wikel, (ed.), *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships*. Wallingford: CABI publishing, 30-61
- Brake, D., Wikel, S.K., Tidwell, J.P., Pérez de León, A.A.** (2010): *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages; *Parasit. Vectors* 103-110
- Brissette, C.A., Haupt, K., Barthel, D., Cooley, A.E., Bowman, A., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P.F., Kraiczy, P., Stevenson, B.** (2009): *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen; *Infect. Immun.* 77, 300-306
- Brossard, M., Wikel, S.K.** (2004): Tick immunobiology; *Parasitology.* 129, 161-167
- Brown, C.R., Blaho, V.A., Loiacono, C.M.** (2003): Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2 1; *J. Immunol.* 171, 893-901
- Burster, T., Beck, A., Tolosa, E., Marin-Esteban, V., Röttschke, O., Falk, K., Lautwein, A., Reich, M., Brandenburg, J., Schwarz, G., Wiendl, H., Melms, A., Lehmann, R., Stevanovic, S., Kalbacher, H., Driessen, C.** (2004): Cathepsin G, and not the asparagine-

specific endoprotease, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes; *J. Immunol.* 172, 5495-5503

Burster, T., Beck, A., Tolosa, E., Schnorrer, P., Weissert, R., Reich, M., Kraus, M., Kalbacher, H., Häring, H.U., Weber, E., Overkleeft, H., Driessen, C. (2005): Differential processing of autoantigens in lysosomes from human monocyte-derived and peripheral blood dendritic cells; *J. Immunol.* 175, 5940-5949

Burster, T., Macmillan, H., Hou, T., Boehm, B.O., Mellins, E.D. (2010): Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond; *Mol. Immunol.* 47,658-665

Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G., Postic, D. (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis; *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 441-448

Caroll, J.A., Garon, C.F., Schwan, T.G. (1999): Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Immun.* 67, 3181-3187

Carrell, R.W., Pemberton, P.A., Boswell, D.R. (1987): The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 527-535

Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Jockey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C. M. (2000): A bacterial genom in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*; *Mol. Microbiol.* 35, 490-516

Cavassani, K.A., Alberti 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; *Immunol.* 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, 747-752

Cinco, M., Cini, B., Murgia, R., Presani, G., Prodan, M., Perticarari, S. (2001): Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages; *Infect. Immun.* 69, 2743-2747

Coburn, J., Cugini, C. (2003): Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin $\alpha v \beta 3$; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 7301-7306

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

Danielová, V., Rudenko, N., Daniel, M., Holubová, J., Materna, J., Golovchenko, M., Schwarzová, L. (2006): Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic; *Internat J. Med. Microbiol.* 296, 48-53

Dennis, D.T., Hayes, E.B. (2002): Epidemiology of Lyme borreliosis. In O. Kahl, J.S. Gray, R.S. Lane, G. Stanek, (eds), Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and control. Oxford: CABI publishing, 251-280

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.C., Teixeira, M.M., Power, C.A.,

- Proudfoot, A.E.I.** (2008): Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity; *J Exp Med* 205, 2019-2031
- Duray, P.H., Steere, A.C.** (1988): Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539, 65-79
- Fahy, R.J., Doseff, A.I., Wewers, M.D.** (1999): Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1; *J. Immunol.* 163, 1755-1762
- Fattorossi, A., Nisini, R., Pizzolo, J.G., D'Amelio, R.** (1989): New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis; *Cytometry* 10, 320-325
- 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., Narasimhan, S., Neelakanta, G., Pal, U., Chen, M., Flavell, R.** (2009): Toll-like receptors 1 and 2 heterodimers alter *Borrelia burgdorferi* gene expression in mice and ticks; *J. Infect. Dis.* 200, 1331-1340
- Fingerle, V., Goettner, G., Gern, L., Wilske, B., Schulte-Spechtel, U.** (2007): Complementation of a *Borrelia afzelii* OspC mutant highlights the crucial role of OspC for dissemination of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*; *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 97-107
- Francischetti, I.M.B., Sá-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M.C.** (2009): The role of saliva in tick feeding; *Front. Biosci.* 14, 2051-2088
- Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C.** (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
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., et al.** (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*; *Nature* 390, 580-586
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M.** (1996): *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis; *Microbiol. Immunol.* 40, 877-881
- Garg, R., Juncadella, I.J., Ramamoorthi, 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
- Ge, Y., Li, Ch., Corum, L., Slaughter, C.A., Charon, N.W.** (1998): Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*; *J. Bacteriol.* 180, 2418-2425
- Gern, L., Humair, P.F.** (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. O. Kahl, J.S. Gray, R.S. Lane, and G. Stanek, editor. CABI Publishing. Oxford, United Kingdom. 149-174
- Gettins, P.G.W.** (2002): Serpin structure, mechanism, and function; *Chem. Rev.* 102, 4751-4804
- Gilmore, R.D., Jr., Piesman, J.** (2000): Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice; *Infect. Immun.* 68, 411-414

- Goldstein, S.F., Buttle, K.F., Charon, N.W.** (1996): Structural analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy; *J. Bacteriol.* 22, 6539-6545
- Gordon, S., Martinez, F.O.** (2010): Alternative activation of macrophages: mechanism and functions; *Immun.* 32, 593-604
- Granucci, F., Foti, M., Ricciardi-Castagnoli, P.** (2005): Dendritic cell biology; *Adv. Immunol.* 88, 193-233
- Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G.** (2002): Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. Wallingford: CABI publishing
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K.** (2010): Development of monocytes, macrophages and dendritic cells; *Science* 327, 656-661
- Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Höök, M.** (1998): Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*; *Mol. Microbiol.* 30, 711-723
- Guo, X., Booth, C.J., Paley, M.A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S., Montgomery, R.R.** (2009): Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins; *Infect. Immun.* 77, 2320-2329
- Haake, D.A.** (2000): Spirochetal lipoproteins and pathogenesis I; *Microbiol.* 146, 1491-1504
- 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
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J.M., Bowman, A.S.** (2004): Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission; *Immunol.* 113, 401-408
- Hed, J., Hallden, G., Johansson, S.G., Larsson, P.** (1987): The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation; *J. Immunol. Methods.* 101, 119-125
- Heinzmann, M., Herzig, D.O., Swain, B., Mercer-Jopnes, M.A., Bergamini, T.M., Polk, H.C.Jr.** (1997): Phagocytosis and oxidative burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4,705-710
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I.J., 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., Kirchning, 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; *J. Immunol.* 163, 2382-2386
- Horká, H., Staudt, V., Klein, M., Taube, Ch., Reuter, S., Dehzad, N., Andersen, J.F., Kopecký, J., Schild, H., Kotsyfakis, M., Hoffmann, M., Gerlitzki, B., Stassen, M., Bopp, T., Schmitt, E.** (2011): The tick salivary protein Sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma; *J. Immunol.* 188, 2669-2676

- Hossain, H., Wellensiek, H.J., Geyer, R., Lochnit, G.** (2001): Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*; *Biochem.* 83, 683-692
- Hovius, J.W.R., de Jong, M.A.W.P., den Dubnem, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S.I., Geutjenbeek, T.B.H.** (2008): Salp 15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization; *PLoS Pathog.* 4, e31
- Hovius, J.W.R., van Dam, A.P., Fikrig, E.** (2007): Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis; *Trends Parasitol.* 23, 434-438
- Chmelař, J., Oliveira, C.J., Řezáčová, P., Francischetti, I.M.B., Kovářová, Z., Pejler, G., Kopáček, P., Ribeiro, J.M.C., Mareš, M., Kopecký, J., Kotsyfakis, M.** (2010): A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation; *Blood.* 117,736-744
- Chu, C.Y., Liu, W., Juany, B.G., Wang, D.M., Juany, W.J., Zhao, Q.M., Zhang, P.H., Wang, Z.X., Tang, G.P., Yang, H., Cao, W.C.** (2008): Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China; *J. Clin. Microbiol.* 46, 3130-3133
- 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
- Jones, L.D., Hodgson, E., Nuttall, P.A.** (1989): Enhancement of virus transmission by tick salivary glands; *J. Gen. Virol.* 70, 1895-1898
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, P.W., Stiegerwalt, A.G., Brenner, D.J.** (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 496-497
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y.** (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp.nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan; *Microbiol. Immunol.* 37, 843-848
- Khan, M.S., Singh, P., Azhar, A., Naseem, A., Rashid, Q., Kabir, M.A., Jairajpuri, M.A.** (2011): Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization; *J. Amino. Acids.*
- Knauer, J., Siegemund, S., Miller, U., Al-Robaiy, S., Kastelein, R.A., Alber, G., Straubinger, R.K.** (2007): *Borrelia burgdorferi* potently activates bone marrow-derived conventional dendritic cells for production of IL-23 required for IL-17 release by T cells; *Immunol. Med. Microbiol.* 49, 353-363
- Kopecký, J., Kuthejlová, M.** (1998): Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanism of natural immunity in vitro; *Par. Immunol.* 20,169-174
- Kotsyfakis, M., Horká, H., Salát, J., Andersen, J.F.** (2010): The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model; *Mol. Microbiol.* 77, 456-470
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.** (2007): Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success if the tick *Ixodes scapularis*; *J. Biol. Chem.* 40, 29256-29262
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Andersen, J.F.** (2006): Antiinflammatory and immunosuppressive activity of Sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*; *J. Biol. Chem.* 36, 26298-26307

- Kovář, L.** (2004): Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission; *Folia Microbiol.* 49, 327-336
- 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
- Kramer, C.D., Poole, N.M., Coons, L.B., Cole, J.A.** (2011): Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21; *Exp. Parasitol.* 127, 665-671
- Kubes, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffová, E., Nuttall, P.A.** (1994): Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro; 82, 113-116
- Kurtenbach, K., Sewel, 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 mechanism of innate immune response against *Borrelia afzelii*; *J. Med. Entomol.* 43, 1208-1214
- Lazarus, J.J., Kay, M.A., McCarter, A.L., Wooten, R.M.** (2008): Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages; *Infect. Immun.* 76, 1153-1162
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O., Baranton, G.** (1997): Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 921-925
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E.** (2002): Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks; *J. Biol. Chem.* 277, 10083-10089
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S.** (2003): Phagocytosis by neutrophils; *Microbes Infect.* 5, 1299-306
- Li, Ch., Bakker, R.G., Motaleb, M.A., Sartakova, M.L., Cabello, F.C., Charón, N.W.** (2002): Asymmetrical flagellar rotation in *Borrelia burgdorferi* nonchemotactic mutants; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6169-6174
- Li, X., Liu, X., Beck, D.S., Kantor, F.S., Fikrig, E.** (2006): *Borrelia burgdorferi* lacking BBK32, a fibronectin-binding protein, retains full pathogenicity; *Infect. Immun.* 74, 3305-3313
- Liang, F.T., Nelson, F.K., Fikrig, E.** (2002): Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J. Exp. Med.* 196, 275-280
- Liang, F.T., Yan, J., Mbow, M.L., Sviat, S.L., Gilmore, R.D., Mamula, M., Fikrig, E.** (2004): *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect. Immun.* 72, 5759-5767
- Lieskovská, J., Kopecký, J.** (2012): Tick saliva suppresses IFN signalling in dendritic cells upon *Borrelia afzelii* infection; *Parasite Immunol.* 34, 32-39
- Lipscomb, M.F., Masten, B.J.** (2002): Dendritic Cells: Immune regulators in health and disease; *Physiol. Rev.* 82, 97-130

- MacIvor, D.M., Shapiro, S.D., Pham, C.T., Belaouaj, A., Abraham, S.N., Ley, T.J.** (1999): Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice; *Blood* 94, 4282-93
- Magnuson, H.J., Eagle, H., Fleischman, R.** (1948): The Minimal Infectious Inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and Consideration of Its Rate of Multiplication *in vivo*; *Am. J. Syph. Gonorh. Ven. Dis.* 32, 1-18
- Macháčková, M., Oborník, M., Kopecký, J.** (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
- Marconi, R.T., Liveris, D., Schwartz, I.** (1995): Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates; *J. Clin. Microbiol.* 33, 2427-2434
- Marchal, C., Schramm, F., Kern, A., Luft, B., Yang, X., Schijf, T., Hovius, J., Jaulhac, B., Boulanger, N.** (2011): Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease; *Infect Immun* 79: 774-785
- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R.S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D.M., Fish, D., Piesman, J.** (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*; *Ticks Tick Borne Dis.* 1, 151-158
- Margos, G., Vollmer, S.A., Kornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K.** (2009): A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes; *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5410-5416
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M.** (2008): Macrophage activation and polarization; *Front. Biosci.* 13, 453-461
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T.** (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1817-1824
- Mejri, N., Brossard, M.** (2007): Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*; *Int. Immunol.* 19, 535-543
- Miller, S.D., McMahon, E.J., Schreiner, B., Bailey, S.L.** (2007): Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing autoimmune encephalomyelitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1103, 179-191
- Miyamoto, K., Masuzawa, T.** (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek (eds), *Lyme Borreliosis: Biology and Control*. Wallingford: CABI publishing, 201-222
- Montgomery, R.R., Lusitani, D., de Boisfleury Chevance, A., Malawista, S.E.** (2004): Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils; *Infect. Immun.* 72, 2989-2994
- Morrison, T.B., Weis, J.H., Weis, J.J.** (1997): *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils; *J. Immunol.* 158, 4838-4845
- Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., Charon, N. W.** (2000): *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10899-10904

- Mulenga, A., Khumthong, R., Chalaire, K.C.** (2009): *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis; *BMC Genomics*. 217
- Nau, R., Christen, H.J., Eiffert, H.** (2009): Lyme disease – current state of knowledge; *Dtsch. Arztebl. Int.* 106, 72-82
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, 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
- Nazareth, R.A., Tomaz, L.S., Ortiz-Costa, S., Atella, G.C., Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., Monteiro, R.Q.** (2006): Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade; *Thromb Haemost* 96, 7-13
- Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D.S., Deponte, K., Fish, D., Kantor, F.S., Fikrig, E.** (2007): Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks; *PLoS Pathog* 3, e 33
- Nuttall, P.A., Jones, L.D., Labuda, M., Kaufman, W.R.** (1994): Adaptations of arboviruses to ticks; *J. Med. Entomol.* 31,1-9
- Oliveira, C.J.F., Carvalho, W.A., Garcia, G.R., Gutierrez, F.R.S., de Miranda Santos, I.K.F., Silva, J.S., Ferreira, B.R.** (2010): Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets; *Vet. Parasitol.* 167, 288-297
- Oliveira, C.J.F., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J.S., de Miranda Santos, I.K.F., Ribeiro, J.M.C., Ferreira, B.R.** (2011): Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties; *J. Biol. Chem.* 286, 10960-10969
- Oosting, M., Berende, A., Sturm, P., ter Hofstede, H.J.M., de Jong, D.J., Kanneganti, T.D., van der Meer, J.W.M., Kullberg, B.J., Netea, M.G., Joosten, L.A.B.** (2010): Recognition of *Borrelia burgdorferi* by NOD2 is central for the induction of an inflammatory reaction; *J. Infect. Dis.* 201, 1849-1858
- Oosting, M., ter Hofstede, H., Sturm, P., Adema, G.J., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., Joosten, L.A.B.** (2011): TLR1/TLR2 heterodimers play an important role in the recognition of *Borrelia* spirochetes; *PLoS ONE* 6, e25998
- Oschmann, P., Kraiczy, P., Halperin, J., Brade, V.** (1999): Lyme borreliosis and tickborne encephalitis. Bremen: UNI-MED
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Narkos, K., Nuttall, P.A., Stuart, D.I.** (1999): Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure; *Mol Cell* 3, 661-671
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R.R., Ramamoorthi, N., Desilva, A.M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, S.F., Telford, S., Anderson, J.F., Fikrig, F.** (2004): TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*; *Cell* 119, 457-468
- Parihar, A., Eubank, T.D., Doseff A.I.** (2010): Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic network of survival and cell death; *J. Innate Immun.* 2, 204-215
- Parola, P., Raoult, D.** (2001): Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat; *Clin. Infect. Dis.* 32, 897-928
- Parveen, N., Cornell, K.A., Bono, J.L., Chamberland, Ch., Rosa, P., Leong, J.M.** (2006): Bgp, a secreted GAG-binding protein of *Borrelia burgdorferi* strain N40, displays

- nucleosidase activity and is not essential for infection of immunodeficient mice; *Infect. Immun.* 74, 3016-3020
- Pechová, J., Štěpánová, G., Kovář, L., Kopecký, J.** (2002): Tick salivary gland extract activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes; *Folia Parasitol.* 49, 153-159
- Peng, B., Koga, K., Cardenas, I., Aldo, P., Mor, G.** (2010): Phagocytosis of apoptotic trophoblast cells by human endometrial endothelial cells induces proinflammatory cytokine production; *Am. J. Repris. Immunol.* 64, 12-19
- Posey, J.E., Gherardini, F.C.** (2000): Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen; *Science.* 288, 1651-1653
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G.** (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. Int; *J. Med. Microbiol.* 297, 263-271
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Henderson, M., Baranton, G.** (1998): Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formely *Borrelia* group DN127) ; *J. Clin. Microbiol.* 36, 3497-3504
- Potempa, J., Korzus, E., Travis, J.** (1994): The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation; *J. Biol. Chem.* 269, 15957-15960
- Prevot, P.P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., et al.** (2006): Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*; *J. Biol. Chem.* 281, 26361-26369
- Prevot, P.P., Beschin, A., Lins, L., Beaufais, J., Grosjean, A., Brus, L., Adam, B., Brossard, M., Brasseur, R., Boudjeltia, K.Z., Vanhamme, L., Godfroid, E.** (2009): Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*; *FEBS. J.* 276, 3235-3246
- 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
- Qiu, W.G., Schutzer, S.E., Bruno, J.F., Attie, O., Xu, Y., Dunn, J.J., Fraser, C.M., Casjens, S.R., Luft, B.J.** (2004): Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14150-14155
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E.** (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host; *Nature* 436, 573-577
- Randolph, G.J., Furie, M.B.** (1995): A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro; *J. Immunol.* 155, 3610-3618
- Ribeiro, J.M.C.** (1995): How ticks make a living; *Parasitol. Today* 11, 91-93
- Ribeiro, J.M.C., Endris, T.M., Endris, R.** (1991): Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities; *Comp Biochem Physiol* 100, 109-112
- Ribeiro, J.M.C., Makoul, G.T., Robinson, D.R.** (1988): *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion; *J Parasitol* 74, 1068-1069
- Ribeiro, J.M.C., Weis, J.J., Telford, S.R. 3rd.** (1990): Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function; *Exp. Parasitol.* 70, 382-388

- Richter, D., Schlee, D.B., Allgöwer, R., Matuschka, F.R.**(2004): Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe; *App. Environment. Microbiol.* 6414-6419
- Rosa, P.A., Tilly, K., Stewart, P.E.** (2005): The burgeoning molecular genetics of Lyme disease spirochaete; *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 129-143
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver Jr., H.J.** (2009b): *Borrelia carolinensis* sp.nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States; *J. Clin. Microbiol.* 47, 134-141
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver Jr., H.J.** (2009a): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp.nov; *J. Clin. Microbiol.* 47, 3875-3880
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L.R., Choi, E.Y., Francischetti, I.M., Andersen, J.F., Shi, G.P., Chavakis, T., Ribeiro, J.M., Kotsyfakis, M.** (2009): The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity; *J. Immunol.* 182,7422-7429
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Andersen, J.F., Mater, T.N., Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B.** (2007): Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cells maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva; *J. Immunol.* 179,1497-1505
- Savina, A., Amigorena, S.** (2007): Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells; *Immunol. Rev.* 219, 143-156
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.M., Seabra, M.C., Rapovo, G., Amigorena, S.** (2006): NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells; *Cell* 126, 205-218
- Sato, Y., Nakao, M.** (1997): Transmission of the Lyme disease spirochaete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice; *J. Parasitol.* 83, 547-550
- Satz, N.** (2002): Klinik der Lyme-Borreliose, 2. Auflage, Bern: Verlag Hans Huber
- Shi, Y., Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T.** (2006): The *dbpBA* locus of *Borrelia burgdorferi* is not essential for infection of mice; *Infect. Immun.* 74, 6509-6512
- Shin, O.S., Isberg, R.R., Akira, S., Uematsu, S., Hegera, A.K., Hu, L.T.** (2008): Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptors 2, 5, and 9 in phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and cytokine induction; *Infect. Immun.* 76, 2341-2351
- Schlecht, G., Mouriès, J., Poitrasson-Rivière, M., Leclerc, C., Dadaglio, G.** (2006): Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo; *Int.Immunol.* 18, 445-52
- Schuijt, T.J., Hovius, J.W., van der Poll, T., van Dam, A.P., Fikrig, E.** (2010): Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge and the future; *Trends Parasitol.* 27, 40-47
- Schulz, O., Edwards, A.D., Schito, M., Alberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., Reis e Sousa, C.** (2000): CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal; *Immunity.* 13, 453-462
- Schutzer, S.E., Fraser-Liqqet, C.M., Casjens, S.R., Qiu, W.G., Dunn, J.J., Monqodin, E.F., Luft, B.J.** (2011): Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*; *J. Bacteriol.* 193, 1018-1020

- Schwan, T.G.** (2003): Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*; *Biochem. Soc. Trans.* 31, 108-112
- 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. USA* 92, 2909-2913
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J., Whisstock, J.C.** (2001): The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature; *J. Biol. Chem.* 36, 33293-33296
- Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., Kopecký, J.** (2008): Tick saliva inhibits dendritic cells migration, maturation and function while promoting development of Th2 responses; *J. Immunol.* 180, 6186-6192
- Slámová, M., Skallová, A., Páleníková, J., Kopecký, J.** (2011): Effect of tick saliva on murine interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells; *Parasite Immunol.* 33, 654-660
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C.M., Kapsenberg, M.L.** (1998): High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals; *Int. Immunol.* 10, 1593-1598
- Steere, A.C.** (1989): Lyme disease; *N. Engl. J. Med.* 321, 586-596
- Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L.** (2004): The emergence of Lyme disease; *J. Clin. Invest.* 113, 1093-1101
- Steere, A.C., Glickstein, L.** (2004): Elucidation of Lyme arthritis; *Nat. Rev. Immunol.* 4, 143-152
- Steere, A.C., Schoen, R.T., Taylor, E.** (1987): The clinical evolution of Lyme arthritis; *Ann. Intern. Med.* 107, 725-731
- Stevenson, B., Schwan, T.G., Rosa, P.A.** (1995): Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Immun.* 63, 4535-4539
- Stoeckle, C., Sommandas, V., Adamopoulou, E., Belisle, K., Schiekofer, S., Melms, A., Weber, E., Driessen, C., Boehm, B.O., Tolosa, E., Burster, T.** (2009): Cathepsin G is differentially expressed in primary human antigen-presenting cells; *Cell Immunol.* 255, 41-45
- Sun, B., Eckhardt, E.R., Shetty, S., van der Westhuyzen, D.R., Webb, N.R.** (2006): Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts; *J. Lipid. Res.* 47, 1700-1713
- Takeda, K., Akira, S.** (2005): Toll-like receptors in innate immunity; *Int. Immun.* 17, 1-14
- Tilly, K., Rosa, P.A., Stewart, P.E.** (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 22, 217-234
- Tuominen-Gustafsson, H., Penttinen, M., Hytönen, J., Viljanen, M.K.** (2006): Use of CFSE staining of borreliae in studies on the interaction between borreliae and human neutrophils; *BMC Microbiol.* 6, 92
- van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.** (2003): DC-SIGN: escape mechanism for pathogens; *Nat. Rev. Immunol.* 3, 697-709

- Wang, X., Coons, L.B., Taylor, D.B., Stevens, Jr. S.E., Gartner, T.K.** (1996): Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*; *J Biol Chem* 271, 17785-17790
- Wang, G., Ma, Y., Buyuk, A., McClain, S., Weis, J.J., Schwartz, I.** (2004): Impaired host defense to infection and Toll-like 2 receptor independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR 2-deficient C3H/HeJ mice; *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 219-225
- Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J.** (1997): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19) ; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 926-932
- Wikel, S.K., Bergman, D.** (1997): Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities; *Parasitol. Today.* 13, 383-389
- Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.** (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49, 13-21
- Wilson, N.S., El Sukkari, D., Villadangos, J.A.** (2004): Dendritic cells constitutively present self-antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling rates of MHC class II synthesis and endocytosis; *Blood* 103, 2187-2195
- Wolgemuth, C.W., Charon, N.W. , Goldstein, S.F., Goldstein, R.E.** (2006): The flagellar cytoskeleton of the spirochetes; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 221-227
- Wooten, R.M., Ma, Y., Yoder, R.A., Brown, J.P., Weis, J.H., Zachary, J.F., Kirschning, C.J., Weis, J.J.** (2002): Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*; *J. Immunol.* 168, 348-355
- Zarnani, A.H., Moazzeni, S.M., Shokri, F., Salehnia, M., Dokouhaki, P., Shojaeian, J., Jeddi-Tehrani, M.** (2006): The efficient isolation of murine splenic dendritic cells and their cytochemical features; *Histochem. Cell. Biol.* 126, 275-82
- Zeidner, N.S., Schneider, B.S., Nuncio, M.S., Gern, L., Piesman, J.** (2002): Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific; *J. Parasitol.* 88, 1276-1278