

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vliv klíčtcích slin na fagocytózu borelií dendritickými
buňkami**

Diplomová práce

Bc. Eliška Maršálková

Školitel: Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.

Školitel specialista: RNDr. Jana Páleníková

České Budějovice 2016

Maršálková E. (2014): Vliv klíštěcích slin na fagocytózu borelií dendritickými buňkami [The effect of the tick saliva on phagocytosis of borrelia by dendritic cells. Mgr. Thesis, in Czech] - p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: In this study we examined the effect of the tick saliva from *I. ricinus* and the effect of recombinant protein IRS-2 from the saliva of *I. ricinus* on dendritic cells derived from the mice bone marrow. We studied their effect on the production of cytokines by dendritic cells after the stimulation by *B. burgdorferi*, their effect on the expression of genes, that participate in phagocytosis, and the impact of the tick saliva on phagocytosis of *B. burgdorferi* by dendritic cells.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, 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 13.12.2016

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych ráda poděkovala všem, co mi s prací pomáhali. Na prvním místě bych chtěla poděkovat své školitelce, Jaroslavě Lieskovské, za její trpělivost a mnoho užitečných rad. Dále bych pak ráda projevila velký vděk Janě Páleníkové, která se mě ujala jako školitel specialista, a vždy byla po ruce, když jsem potřebovala s něčím pomoci. Celkově bych ráda poděkovala všem z naší laboratoře, kteří nikdy neváhali podat pomocnou ruku, byť třeba jen s odšroubováním nástavce u centrifugy. Jsem velice vděčná, že mi bylo umožněno v laboratoři pracovat.

V poslední radě bych ráda poděkovala rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Obsah

1	LITERÁRNÍ PŘEHLED	1
1.1	ROD BORRELIA	1
1.2	LYMESKÁ BORELIÓZA	2
1.3	KLÍŠTĚ	4
1.4	VZTAH KLÍŠTĚTE A BORÉLIÍ	5
1.5	REAKCE HOSTITELE NA INFEKCI <i>B. BURGDORFERI</i>	6
1.6	DENDRITICKÉ BUŇKY	8
1.7	FAGOCYTÓZA	12
1.7.1	COILING FAGOCYTÓZA	18
1.7.2	FAGOCYTÓZA DENDRITICKÝCH BUNĚK	19
1.8	ÚNIK BORÉLIE IMUNITNÍMU SYSTÉMU	20
1.9	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HOSTITELE	22
2	CÍLE PRÁCE	26
3	MATERIÁL A METODIKA	27
3.1	MATERIÁL	27
3.1.1	MYŠI	27
3.1.2	KLÍŠTATA A SLINY	27
3.1.3	BORELIE	27
3.1.4	REKOMBINANTNÍ PROTEIN IRS-2	28
3.2	METODY	28
3.2.1	MĚŘENÍ PRODUKCE CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI	28
3.2.2	MĚŘENÍ FAGOCYTÓZY BORELIÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI	31
3.2.3	EXPRESSE GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZY V DENDRITICKÝCH BUŇKÁCH	33
4	VÝSLEDKY	36

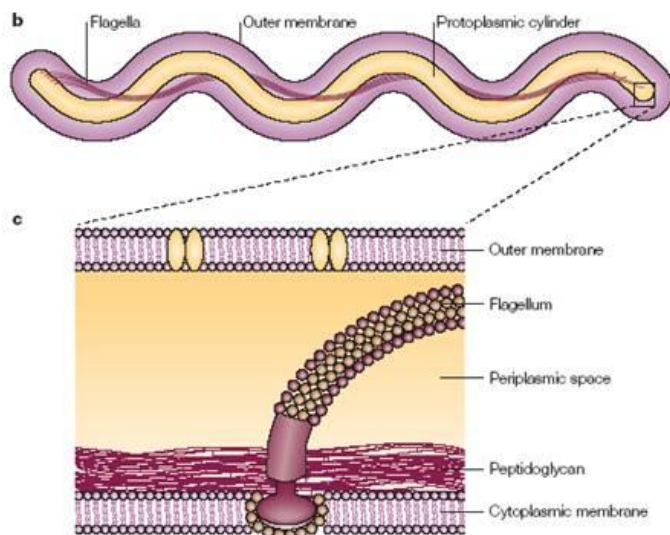
4.1	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA PRODUKCI CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI	36
4.1.1	Stanovení relativního množství cytokinů a chemokinů pomocí Mouse Cytokine Array Panel	
A	36	
4.1.2	Stanovení produkce cytokinů metodou ELISA	39
4.1.3	Stanovení produkce chemokinů metodou ELISA	41
4.2	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA FAGOCYTÓZU BORELIÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI 42	
4.3	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA EXPRESI GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZOU 46	
4.3.1	Fagocytární array.....	46
4.3.2	Real-time PCR	49
5	DISKUZE.....	50
5.1	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN A REKOMBINANTNÍHO PROTEINU IRS-2 NA PRODUKCI CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI	50
5.2	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA FAGOCYTÓZU BORELIÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI 52	
5.2.1	OPTIMALIZACE METODY – DERIVACE A MĚŘENÍ	52
5.2.2	OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY DCs.....	53
5.3	VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN A REKOMBINANTNÍHO PROTEINU IRS-2 NA EXPRESI GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZOU	54
6	ZÁVĚR.....	57
7	SEZNAM ZKRATEK.....	58
8	POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA	61

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 ROD BORRELIA

Borelie jsou gramnegativní aerofilní bakterie, které taxonomicky spadají do třídy Spirochaetes, řádu Spirochietales a čeledi Spirochaetaceae. Je 52 známých druhů rodu *Borrelia*. Jednadvacet z nich patří do skupiny způsobující lymeskou boreliózu, 29 je původcem tzv. návratné horečky (relapsing fever) a 2 jsou členy třetí skupiny (Cutler et al, 2016).

Délka spirochét se různí – mohou být dlouhé 8 μm (*B. coriaceae* sp.) (Burgdorfer et al, 1982; Hovind-Hougen, 1984) až 20-30 μm (*B. burgdorferi*) (Lane et al, 1985). Šířka spirochét se udává od 0,2-0,3 μm (*B. burgdorferi*) (Burgdorfer et al, 1982; Hovind-Hougen, 1984) až k 0,35-0,5 μm (*B. recurensis* a *B. persica*) (Hovind-Hougen, 1974; Karmi et al, 1979). Jako pro ostatní spirochéty pro ně platí, že buňky mají helikální tvar a jejich vnější membrána obklopuje protoplasmatický cylindrický komplex skládající se z peptidoglykanu, vnitřní buněčné membrány a cytoplasmy. Bičíky se nenachází na povrchu buňky, nýbrž v periplasmatickém prostoru mezi vnější membránou a protoplasmatickým cylindrem (Holt, 1978; Johnson 1977). Jsou přichyceny na obou koncích buněk, je jich 7-11 a u středu buňky se vzájemně překrývají (Barbour & Hayes, 1986). Bičíky jsou složeny ze dvou proteinů – FlaB, který má v bičících majoritní zastoupení, a FlaA (Ge et al, 1998). Bičíky slouží nejen k charakteristickému šroubovitému pohybu bakterie, ale též k udržení buněčného tvaru (Motaleb et al, 2000). Schématický nákres borelie je na obrázku 1.



Obr. 1: Schematický nákres borelie (Rosa et al, 2005).

B. burgdorferi má neobvyklý genom skládající se z lineárního chromozomu o 910 kilobázích a nejméně 12 lineárních a 9 kruhových plasmidů. Některé z plasmidů kódují proteiny fungující jako faktory virulence, k nimž patří i lineární plasmid lp-28 kódující antigenní variace. Kultivaci může dojít ke ztrátě některých z nich, čímž i k poklesu či ztrátě virulence. Bakteriální genom borelií obsahuje geny pro hemolýzu a opravy DNA a proteiny pro vypuzení antibiotik (Casjens, 2000). Nemají však žádné geny pro biosyntézu živin a pro přežití a růst tedy potřebuje komplexní živné médium (Barbour & Hayes, 1986; Tilly et al, 2008).

Jak bylo řečeno výše, borelie jsou původcem závažného onemocnění lymeská borelióza, které je nejčastější infekcí přenášenou klíšťaty v České republice a zároveň nejčastější antropozoonózou v Evropě, Asii a Severní Americe.

1.2 LYMESKÁ BORELIÓZA

Lymeská borelióza je infekční onemocnění způsobené některými druhy rodu *Borrelia*. V Evropě a Asii jsou za nejvíce případů lidských onemocnění zodpovědné tři druhy rodu *Borrelia*: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii* a *B. afzelii*, které společně spadají pod komplex *B. burgdorferi* sensu lato (Baranton et al, 1992). Ve Spojených státech amerických je hlavním viníkem onemocnění druh *B. burgdorferi* s.s. (Stanek et al, 2012).

Klinický popis lymeské boreliózy jako infekčního onemocnění poskytl Dr. Alan Steere s kolegy až v roce 1977, přestože její příznaky byly zaznamenány již dříve. V té době byla také vyslovena domněnka, že je onemocnění možná přenášeno členovci (Arthropoda) na základě geografickému umístění nakaženého obyvatelstva a sezónnímu výskytu nálezů (Steere et al, 1977). Následně byly Dr. Willy Burgdorferem a jeho spolupracovníky pozorovány spirochety ve tkáni zažívacího traktu klíšťat, která byla nasbírána v endemické oblasti výskytu lymeské boreliózy (Burgdorferi, 1982). Když byly tyto spirochety injikovány do králíků, objevila se na kůži pokusných zvířat vyrážka podobná erythema migrans a séra pacientů s lymeskou boreliózou reagovala s bakteriemi v nepřímé imunofluorescenční assayi. Bakterie tak dostala název po svém objeviteli – *Borrelia burgdorferi* (Johnson et al, 1984). Nakonec byla bakterie kultivována i z pacientů nakažených lymeskou boreliózou, čímž se oficiálně potvrdil původce této nemoci (Steere et al, 1989).

Typické symptomy lymeské boreliózy se obvykle dělí do tří fází, z nichž první fáze propuká první až druhý týden po přenosu a vyznačuje se charakteristickou šířící se červenou skvrnou s centrálním vyblednutím v místě přisátí klíštěte, nazývaná erythema migrans (Wormser et al, 2006). Spolu s ní se mohou objevit i typické chřipkové příznaky jako je nevolnost, horečka či bolesti kloubů. Až u 20% případů neléčených infekcí je toto stádium jediným projevem lymeské boreliózy (Nowakowski et al, 2009; Nowakowski et al, 2001; Wormser et al, 2005)

Několik měsíců po první fázi se u pacientů může objevit fáze druhá, při které se spirochety šíří z kůže do sekundárních orgánů. V této fázi bývá obvykle napaden nervový systém hostitele, což způsobí lymeskou neuroboreliózu – LNB, dále druhá fáze postihuje srdce (karditida), klouby či oči (Bartůněk et al, 2006; Duray & Steere, 1988).

Pokud nemoc není léčena vhodnými antibiotiky, může se po několika měsících až letech projevit třetí, chronická fáze onemocnění. Vyznačuje se hlavně jako acrodermatitis chronica atrophicans – ACA, Herxheimerova nemoc, projevující se výraznou atrofií a ztenčením kůže, a chronická artritida, která je velice těžce léčitelná. Chronická neuroborelióza má formu chronicky progresivní encefalomyelitidy, postihuje kognitivní a paměťové funkce či se projevuje jako chronická periferní neuropatie (Wormser et al, 2000; Aberer, 2007).

Borelie infikují širokým spektrem obratlovců, hostiteli mohou být savci, ještěrky i ptáci (Anderson & Magnarelli, 1985; Anderson et al, 1986; Levin et al, 1985; Donahue et al, 1987; Brown & Lane, 1992; Levine et al, 1996; Clark et al, 2005). Klíšťata rodu *Ixodes* přenáší spirochéty mezi hostiteli a zatím se ukázaly být jedinými přírodními vektory, které mohou lymeskou boreliózou nakazit člověka (Lane et al, 1991). Světově se vektorů a rezervoárů infekce liší a překrývají – na severovýchodě a středovýchodě Spojených států je primárně lidská infekce přenášena klíšťetem *Ixodes scapularis*, na západě *I. pacificus* (Burgdorfer et al, 1985)). V Evropě a Asii jsou hlavními vektory nákazy *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Gern & Humair, 2002; Korenberg et al, 2002).

1.3 KLÍŠŤĚ

Klíšťata patří do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepíkatci (Chelicera), třídy pavoukovci (Arachnida), podtřídy roztoči (Acari) a řádu klíšťatovci (Ixodida). Jsou to obligátní krev sající ektoparazité, napadající širokou škálu hostitelů – savce, ptáky, plazy i obojživelníky (Anderson & Magnarelli, 2008). Klíšťata dělíme do tří čeledí – Ixodidae, tzv. „tvrdá klíšťata,“ Argasidae, neboli „měkká klíšťata (Oschmann et al, 1999),“ a pak méně významné Nuttalliedae (Anderson & Magnarelli, 2008).

Klíšťata fungují jako vektory a rezervoáry mnoha patogenů, z nichž některé jsou přenosné i na člověka. Patogeny mohou být rickettsie a jiné bakterie, viry a protozoa. Nejznámějšími bakteriálními onemocněními přenášenými těmito členovci jsou lymeská borelióza, návratná horečka (relapsing fever), tyfus, horečka skalistých hor, skvrnitá horečka způsobená rickettsií *R. helvetica*, ehrlichiozní anaplasmóza a tularémie. Mezi virové nákazy přenášené klíšťaty patří klíšťová meningoencefalitida, Kolorádská klíšťová horečka a Krymsko-konžská hemoragická horečka. Z protozoí přenášejí klíšťata babeziózu (Parola et al, 2005; Spach et al, 1993; Burgdorfer, 1975; Mixson et al, 2006; Olano & Walker, 2002). Klíšťata též mohou způsobit tzv. klíšťecí paralýzu, která není způsobena žádnými infekčními organismy, nýbrž neurotoxinem produkovaným ve slinných žlázách těchto roztočů (Edlow & McGillicuddy, 2008).

V Evropě je nejvíce zastoupen druh *Ixodes ricinus* z čeledi Ixodidae. Toto „tvrdé“ klíšťe se vyznačuje typickým tříhostitelským cyklem, kdy každé stádium (obr. 2) saje pouze na jednom hostiteli. V přírodních podmínkách trvá vývoj klíšťete 2-3 roky. Dospělá

oplozená samice naklade několik tisíc vajíček, z nichž se vylíhnou šestinohé larvy. Ty obvykle sají na drobných obratlovcích, které po nasátí opouštějí a přemění se v osminohé nymfy. Po dalším nasátí se nymfa mění v osminohého dospělého. V dospělém stádiu již saje jen samička, obvykle po dobu 5-12 dní, zatímco sameček se s ní během sání spáří a oplodní ji. Samička poté naklade vajíčka a uhyne (Walker, 2001).



Obr. 2: Vývojová stádia klíštěte *I. ricinus* – larva, nymfa, dospělec samice a dospělec samec (Humair & Gern, 2000).

1.4 VZTAH KLÍŠTĚTE A BORELIÍ

Při sání klíštěte je umožněn přenos borelií z infikovaného klíštěte na nového hostitele. Tento přenos je usnadňován látkami obsaženými v klíštěcích slinách.

Borelie obvykle nejsou schopny jiného přenosu než přenosu vektorem – klíštětem, jehož sliny usnadňují přenos, přežití a množení patogenu v novém hostiteli (Nuttall et al, 1994). Souhrnně se tomuto způsobu přenosu, kdy krev sající vektor napomáhá složením svých slin přenosu infekčního agens, říká SAT (saliva-assisted transmission) – slinami asistovaný přenos (Jones et al, 1987). Vzhledem k tomu, že transovariální přenos borelií v klíštěti nebyl pozorován, všeobecně se předpokládá, že borelie se do klíštěte dostávají při sání krve nakažených hostitelů, obvykle divokých hlodavců (Pal et al, 2003; Munderloh

& Kurtti, 1995). Spirochéty diseminují spolu s pozřenou krví z nakaženého hostitele do klíštěte, kterému kolonizují střevo. Ve střevě zůstávají až do dalšího sání, kdy část spirochet střevo opustí, ivaduje do slinných žláz a spolu se slinami se přenáší na dalšího hostitele (de Silva & Fikrig, 1995).

Povrchový protein OspA se na povrchu *B. burgdorferi* vyskytuje hojně, ale během sání klíštěte a přenosu do dalšího hostitele je silně down-regulovaný (Schwann et al 1995; Ohnishi et al, 2001). Studie naznačují, že OspA je adhesin nutný k přežití a udržení spirochet v klíštěcím střevě, než dojde k sání a přenosu patogenu na dalšího hostitele. Přichycuje se ke klíštěcímu receptoru TROSPA (tick receptor for OspA) (de Silva et al, 1997; Pal et al, 200; Yang et al, 2004). OspB, další střevní adhesin (Fikrig, 2004), BptA, lipoprotein neznámé funkce, a produkt genu BB0690, který pravděpodobně dopomáhá k rezistenci proti oxidativnímu stresu (Boylan et al, 2003), jsou nejspíše též součástí strategie přežití bakterie v klíštěti (Neelakanta et al, 2007; Revel et al, 2005; Li et al, 2007).

Během sání klíštěte se spirochety aktivují, zmnoží se a putují do slinných žláz. Migrace a přenos do hostitele trvá většinou 48-60 hodin, takže k nákaze při včasném odstranění klíštěte nemusí dojít. Při sání dochází vlivem vnějších signálů jako je teplota a pH a vlivem RpoN-RpoS regulační kaskády, která je nutná pro migraci borelií do slinných žláz, ale ne pro přežití v klíštěti (Fisher et al, 2005), ke snížení exprese OspA a zvýšení exprese OspC na buněčném povrchu. OspC usnadňuje migraci do slinných žláz a je nezbytně nutný k infikování dalšího hostitele (Caroll et al, 1999; Schwann et al, 1995; Stevenson et al, 1995; Gilmore & Piesmam, 2000; Fingerle et al, 2007, Schwan, 2003).

1.5 REAKCE HOSTITELE NA INFEKCI *B. BURGDORFERI*

Po proniknutí do hostitele vyvolávají borelie silnou imunitní odpověď, které se účastní jak vrozená nespecifická imunita, tak imunita specifická získaná.

Spirochety *B. burgdorferi* obsahují hodně lipoproteinů, které jsou rozpoznávány hlavně přes TLR2 (Hirschfeld et al, 1991), ale i jiné TLR receptory jako je TLR7 a TLR9 se aktivují boreliemi (Petzke et al, 2009). Rozpoznání vede k produkci prozánětlivých mediátorů jako jsou interleukiny IL-1 β , IL-6, IL-10 a IL-12, a k produkci tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) monocyty, makrofágy, neutrofily a dendritickými buňkami

(DCs) (Suhonen et al, 2003; Dennis et al, 2009; Steere et al, 2004; McKisic & Barthold, 2000). Tyto cytokiny jsou nutné k přivolání dalších složek vrozené imunity, ale také k vývoji získané imunity (McKisic & Barthold, 2000). IL-1 je všeobecně prozánětlivý cytokin, IL-6 stimuluje maturaci B-lymfocytů (Habicht et al, 1985) a TNF se účastní zánětlivé odpovědi (Radolf et al, 1991; DeFosse & Johnson, 1992). Druhou linií obrany hostitele tvoří získaná imunita, která se skládá z T a B lymfocytů, jejichž aktivace postupně vede k odstranění spirochet. Aktivované T-pomocné (Th) buňky se diferencují na Th1, Th2, Th17 a Th regulační buňky (Zhu & Paul, 2008). Th1 buňky jsou zodpovědné za imunitní odpověď proti intracelulárním parazitům, zatímco Th2 jsou zodpovědné za imunitu proti extracelulárním (Mosmann & Sad, 1996). Efektorovými buňkami Th1 imunity jsou hlavně makrofágy, stimulované INF γ , zatímco za efektorové buňky Th2 imunity považujeme hlavně žírné buňky, stimulované IL4. INF γ a IL-4 se proti sobě chovají antagonisticky a zároveň se negativně ovlivňují. Th 17 buňky produkují IL-17 a účastní se obrany proti houbám a některým extracelulárním bakteriím (Peck & Mellins, 2010).

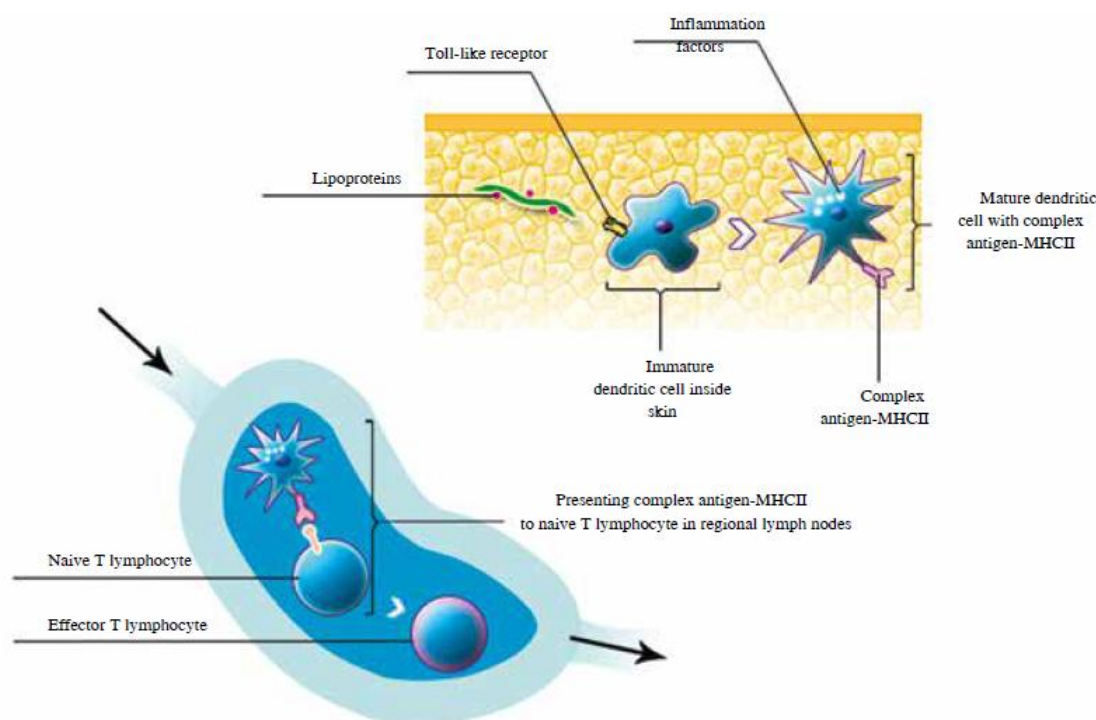
Spirochety mohou být též zabity komplementovou kaskádou, nejčastěji její alternativní cestou, kterou aktivují složky bakteriálních povrchů. Faktor C3 se tak štěpí alternativní C3-konvertázou na C3a a C3b. Fragmenty C3b se váží na buněčný povrch patogenu a fungují jako opsoniny, zatímco fragmenty C3a mají chemotaktický účinek pro fagocytující buňky. Z části molekul C3-konvertázy pak vznikají komplexy C5-konvertázy, štěpící C5 na C5a a C5b, což vede ke zformování komplexu atakujícího membránu (MAC) a lýze buňky (Hovius et al, 2007). *B. burgdorferi* je však schopná komplementové kaskádě několika způsoby uniknout (Hallwage et al, 2001; Alitalo et al, 2001; Alitalo et al, 2002; Kraiczy et al, 2001a; Kraiczy et al, 2001b; Kraiczy et al, 2003; Pausa et al, 2003).

Jednou z hlavních složek imunitního systému, která se účastní imunitní reakce proti boreliím, jsou dendritické buňky.

1.6 DENDRITICKÉ BUŇKY

Dendritické buňky jsou buňky imunitního systému považované za neúčinnější APCs. Představují spojující článek mezi rychlou antigenně nespecifickou a pomalu se rozvíjející antigenně specifickou částí imunitního systému.

DCs jsou speciální leukocyty vznikající z CD34 pozitivních prekurzorů v kostní dřeni, které migrují do různých orgánů, kde se dále diferencují (Galy et al, 1999). Mezi tyto orgány patří především tkáně, které přichází do styku s vnějším prostředím, jako jsou trávicí trakt, dýchací trakt a kůže (Granucci et al, 2005; Lipscomb & Masten, 2002). DCs zastávají jedinečnou funkci (Obr. 3) v imunitní odpovědi – jsou spojením nespecifické a specifické imunity (Steinman, 1991). Naivní DCs neustále pomocí fagocytózy, makropinocytózy, receptorem zprostředkované endocytózy nebo přímým kontaktem s apoptotickými či infikovanými buňkami sbírají antigeny a prezentují je na svém povrchu (Albert et al, 1998). Jejich hlavním úkolem není destrukce patogenu, ale prezentace jeho antigenů imunitnímu systému (Steinman, 1991). Nezralé DCs zachytí patogen, zpracují ho, migrují do lymfatických uzlin, kde jako zralé DCs prezentují antigen naivním T-buňkám, a zároveň u nich dojde ke zvýšení exprese MHCII molekul. T-lymfocyty se po interakci s DCs aktivují a dojde k jejich další diferenciaci (Banchereau & Steinman 1998; Granucci et al, 2005).



Obr. 3: Role dendritických buněk v imunitě (Moniuszko et al, 2013).

DCs jsou děleny do několika podskupin:

- buňky první linie obrany – Langerhansovy buňky (CD1a+) v epitelu a mukózních membránách
- myeloidní DCs (CD11c+; mDCs) v mnoha tkáních na místech potencionálního kontaktu s antigeny v periferních lymfatických orgánech a krvi, vyvíjí se z myeloidní kmenové buňky, jsou vysoce efektivní v prezentaci Ag a stimulaci T-buněk (Steinman, 2012; Benach et al, 1984; Pashenkov et al, 2001)
- plasmacytoidní DCs (CD11c; pDCs) v krvi a periferních lymfatických orgánech v místech hojných na T-lymfocyty, vyvíjí se z plasmacytoidní kmenové buňky, speciálně uzpůsobené k produkci $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$, INF-I (Liu, 2005), Ag jsou schopné efektivně prezentovat až po patogenem navozené aktivaci (Villadangos & Young, 2008; Benach et al, 1984; Pashenkov et al, 2001).

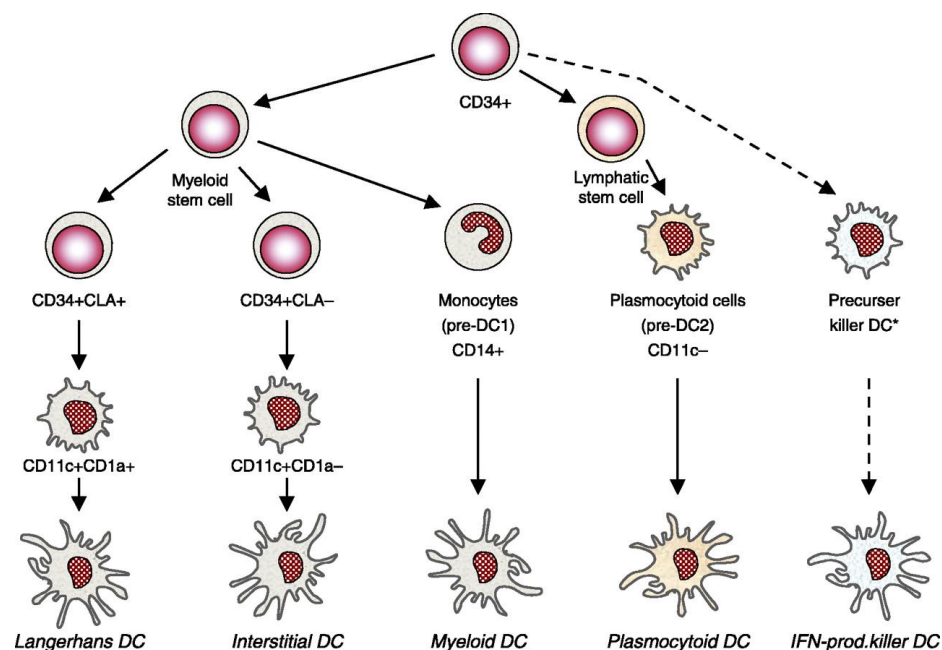
mDCs exprimují vysoké množství MHCII molekul, mají vysokou schopnost fagocytózy, ale nemohou se rozmnožovat, zatímco pDCs exprimují vysoké množství TLR7 a TLR9 molekul, jejich schopnost fagocytózy je nízká, ale jsou schopny produkovat vysoké množství INF v odpovědi na infekci (Pashenkov, 2001).

I když hlavním znakem pDCs je produkce interferonů typu I, bylo dokázáno, že jsou schopny stát se antigen prezentujícími buňkami a za přítomnosti IL3 během maturace navozovat Th2 odpověď (Pashenkov, 2001).

Jak již bylo zmíněno, mDCs pohlcují patogeny, což způsobí jejich maturaci, migraci do sekundárních lymfatických uzlin a prezentaci antigenů T lymfocytům. V závislosti na okolnostech maturace (druh a síla Ag, přítomnost cytokinů apod.) mDCs navozují Th1 (buněčná odpověď T lymfocytů), nebo Th2 (humorální odpověď B lymfocytů) odpověď (Pashenkov, 2001). Aby bylo dosaženo aktivace T lymfocytů, musí buňka od mDC dostat tři signály. Prezentace antigenu molekulou MHCII představuje první signál. Druhý signál je podmíněn zvýšenou expresí kostimulačních molekul CD40, CD80 a CD86 na DCs. Třetí signál pak určuje polarizaci odpovědi. Pokud DCs sekretují IL-12, vyvine se odpověď směrem k Th1, zatímco za jeho nepřítomnosti navozují imunitu Th2 (Villadangos & Young, 2008). Mechanismus navození Th2 imunity ještě není plně

známý, předpokládá se, že mDCs ji navozují za přítomnosti signálů jako je EDN (eosin-derived neurotoxin) či antigeny helmintů a podobně (McDonald & Maizels, 2008).

Vzhledem k vysoké heterogenitě populací se DCs dále rozdělují do mnoha dalších podskupin v závislosti na jejich povrchových znacích, produkovaných cytokinech a vlastnostech (Merad et al, 2013). Některé z podskupin DCs jsou na obrázku 4.



Obr. 4: Linie dendritických buněk (Schott, 2006).

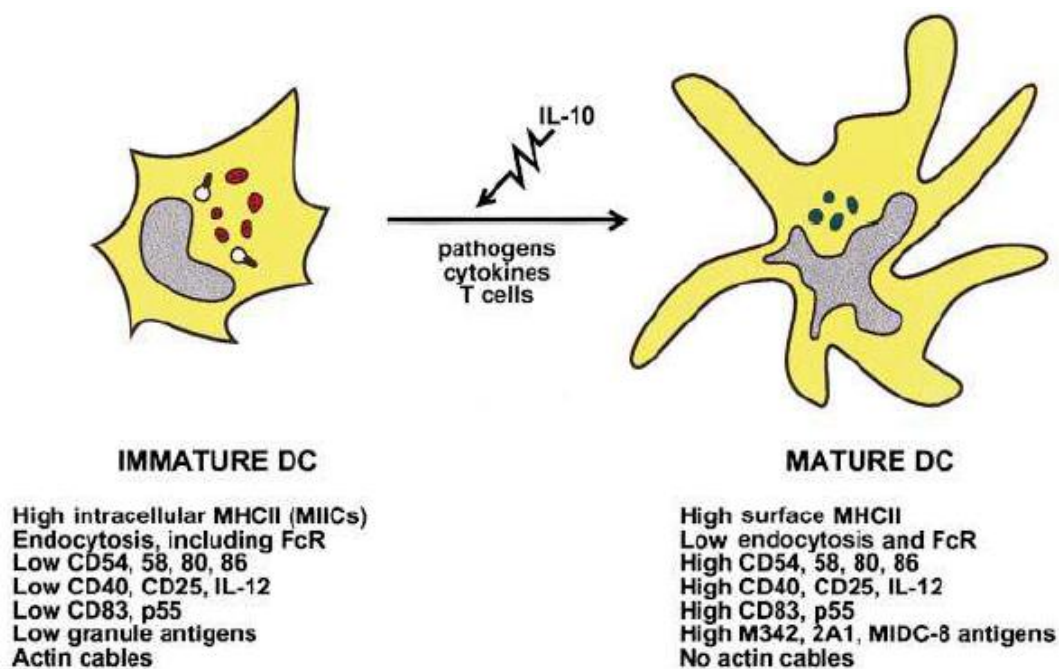
K rozpoznání patogenů DCs slouží pattern-recognition receptors (PRRs) na jejich povrchu, které rozpoznávají pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), mezi které patří hlavně lipopolysacharid z gramnegativních bakterií, lipoproteiny, petidoglykany, mikrobiální DNA a jiné vysoce konzervované struktury patogenů, které se nenachází u savců (Granucci et al, 2005). Hlavními PRRs jsou Toll-like receptory (TLRs) (Medzhitov & Janeway, 2000). Na obrázku 4 jsou vypsány známé TLRs a jejich ligandy.

Receptor	Ligand	Původ ligandu
TLR1/TLR6 (heterodimer)	Triacylové lipopeptidy Solubilní faktory	Bakterie a mykobakterie Neisseria meningitidis
TLR2/TLR1 (heterodimer)	Lipoprotein/lipopeptidy Peptidoglykan Lipoteichoová kyselina Lipoarabinomanan Glykoinositolfosfolipidy Glykolipidy Poriny Atypický lipopolysacharid Atypický lipopolysacharid Zymosan Hsp 70	Různé patogeny Grampozitivní bakterie Grampozitivní bakterie Mykobakterie Trypanosoma cruzi Treponema maltophilum Neisseria Leptospira interrogans Porphyromonas gingivalis Plísňe Hostitel
TLR3	Dvojláknová RNA Poly (IC)	Viry Syntetické sloučeniny
TLR4 (homodimer+ MD2, CD14)	Lipopolysacharid Taxol Fúzní protein Hsp 60 Hsp 70 Fibronektin Oligosacharidové fragmenty kyseliny hyaluronové Fragmenty heparan sulfátu Fibrinogen	Gram-negativní bakterie Rostliny RSV virus Chlamydia pneumoniae Hostitel Hostitel Hostitel Hostitel Hostitel
TLR5	Flagellin	Bakterie
TLR6/TLR1 (heterodimer)	Diacylové lipopeptidy Lipoteichoová kyselina Zymosan	Mykoplazmata Grampozitivní bakterie Plísňe
TLR7	Imidazochinolin, loxoribin, broprimin Jednovláknová RNA	Syntetické sloučeniny Viry
TLR8	Imidazochinolin Jednovláknová RNA	Syntetické sloučeniny Viry
TLR9	Nemetylované CpG sekvence prokaryotické DNA	Bakterie a viry
TLR10	Neznámý	Neznámý
TLR11	Neznámý	Uropatogenní bakterie

Obr. 5: TLR receptory, jejich ligandy a původ ligandů (Hořejší a Bartůňková, 2005)

Aby byly DCs schopné aktivovat naivní T-lymfocyty, musí u nich dojít k maturaci. Maturace je obvykle spuštěna produkty mikrobiálních a virových patogenů jako jsou LPS, CpG DNA nebo dsRNA (Kaisho & Akira, 2001). K maturaci může též docházet vlivem prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α a IL-1 β . Bylo ovšem též dokázáno, že v buněčných kulturách DCs může dojít k maturaci i mírným narušením kultury (Pierre et al, 1997). To může být problém při provádění některých experimentů, jelikož jsou k nim nezbytné naivní DCs. Známkou maturace bývá zvýšená exprese

molekul MHCII na jejich buněčném povrchu (Cella et al, 1997a; Pierre et al, 1997). Dalšími znaky maturace je zvýšená exprese kostimulačních molekul CD40, CD80 a CD86, stejně tak jako sekrece mnoha cytokinů a chemokinů (Cella et al, 1997b; Luster, 2002; Banchereau & Steinman, 1998). Za znak kompletně zralých DCs je považován CD83 (Zhou & Tedder, 1996; Zhou & Tedder, 1998). Rozdíly mezi nezralými a zralými DCs jsou na obrázku 6.



Obr. 6: Rozdíl naivních a maturovaných dendritických buněk (Banchereau & Steinman, 1998).

Prezentaci antigenu dendritickými buňkami předchází pohlcení cizorodé částice mechanismem fagocytózy.

1.7 FAGOCYTÓZA

Fagocytóza je děj, při kterém dochází k pohlcení a zničení cizorodého materiálu, např. bakterií či vlastních poškozených a odumřelých buněk.

Jhbpá se o endocytický proces pohlcování pevných částic z okolního prostředí buňkami. Buňky rozpoznávají a pohlcují částice větší než 0,5 μ m do vakuol opatřených membránou tzv. fagozomů. Takto se buňky zbavují cizorodých částic, mikrobů a poškozených či nakažených buněk vlastního těla. Fagocytóza je prvním krokem

k zahájení hostitelské obrany a zánětu, odstraňuje obrovské množství starých buněk, které každodenně umírají, a má svojí úlohu při embryonálním vývoji a přestavování tkání (Anderen & Underhill, 1999; Underhill & Ozinsky, 2002).

Fagocytóza se objevila již v počátcích evoluce, kdy jí jednobuněčné organismy využívaly jako způsob výživy, zatímco u mnohobuněčných organismů se vyvinuly specializované fagocyty ještě před vývinem vaskulárního systému. Profesionální fagocyty se setkávají s rozmanitou škálou částic, od patogenů až k apoptotickým buňkám, takže musí nést různé receptory k rozpoznávání a zachycení těchto odlišných cílů.

Fagocyty neboli buňky schopné fagocytózy, dělíme na „neprofesionální“ a „profesionální“, v závislosti na stupni jejich schopnosti fagocytovat. Všechny savčí buňky jsou schopny z prostředí přijmout makromolekuly a částice v rámci pinocytózy („buněčného pití“, malé částice, hl. tekutiny a plyny) či pomocí receptory zprostředkované endocytózy (Doherty & McMahon, 2009). Profesionální fagocyty jsou oproti nim vybaveny mnohem větším množstvím receptorů pro receptory zprostředkované pohlcení, jejich membrána je specializována a jsou schopny pohltit mnohem větší částice s mnohem větší specifitou. Mezi profesionální fagocyty patří mnoho druhů bílých krvinek, jako jsou neutrofilů, monocytů, makrofágů a dendritické buňky (Hořejší & Bartůňková, 2005).

Schopnost makrofágů pohltit a degradovat ať už cizorodé částice či buňky vlastního těla a prezentovat jejich antigeny závisí na tkáních, kde makrofágy sídlí. Například subkapsulární sinové makrofágy efektivně sbírají vzorky svého prostředí, avšak mají jen omezenou schopnost jejich degradace a prezentace antigenů. Tyto buňky prohledávají periferní mízní uzliny, sbírají v nich antigeny a předávají je schopnějším antigen prezentujícím buňkám, jako jsou dendritické buňky a folikulární DCs, které zachycují opsonizovaný Ag CR1, CR2 a FcγRIIb a takto ho prezentují B lymfocytům v germinálních centrech, aby se z nich mohly stát paměťové buňky (Cyster, 2010; Phan et al, 2007; Carrasco & Batista, 2007; Junt et al, 2007; Szakai et al, 1983; Asano et al, 2011).

Aktivace makrofágů může být způsobena mnoha podněty v jejich mikroprostředí – cytokiny produkovanými buňkami vrozené i získané imunity, ligandy receptorů spřažených s G proteinem, ligandy TLR receptorů a přítomností cílů jako jsou apoptické buňky (Mosser & Edwards, 2008). Některé studie dokonce prokazují, že aktivace

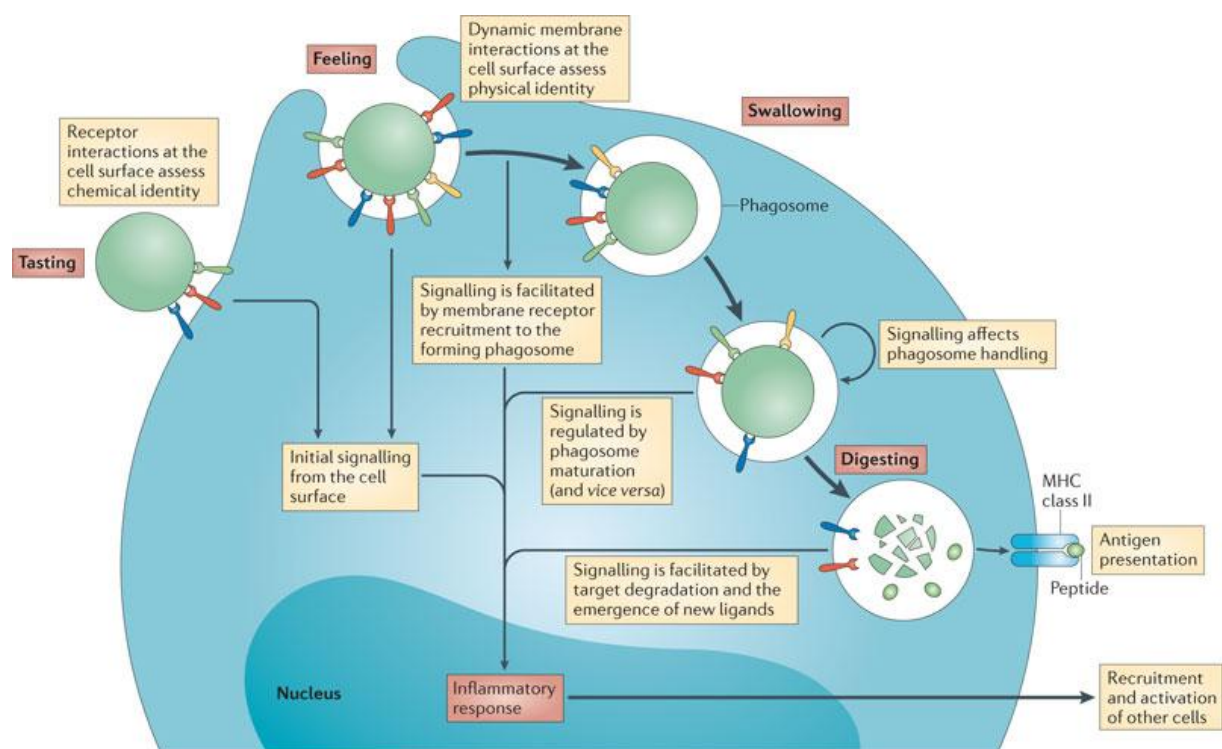
makrofágů může být ovlivněna přímo tvarem buněk a stupněm adheze (McWhorter et al, 2013).

Fagocytujícími buňkami je rozeznáváno velké množství ligandů (Underhill & Ozinsky, 2002). Efektivní rozpoznání těchto ligandů vyžadovalo evoluci vysokého počtu receptorů s odlišnou selektivitou. Mnoho typů receptorů je exprimováno na jednom fagocyty a spolupracuje v detekci a pohlcení částic, ovšem ne všechny receptory, které se fagocytózy účastní, jsou tzv. fagocytárnými receptory (Obr. 7). Některé slouží k navigaci a modulaci odpovědi, přičemž samy jsou neschopné fagocytózu zahájit.

Receptory	Ligandy	Reference
Oponizující receptory		
Fc receptory		
FcγRI (CD64)	vysoká afinita k IgG1-IgG3>IgG4	Bruhns et al, 2009; Anderson et al, 1990
FcγRIIa (CD32a)	nízká až střední afinita k IgG1>IgG2, IgG3, IgG4	Bruhns et al, 2009; Anderson et al, 1990
RIIc (CD32c)	nízká afinita k IgG1, IgG3, IgG4	Bruhns et al, 2009; Anderson et al, 1990
RIIIa (CD16a)	vysoká afinita k IgG3, nízká až střední k IgG1>IgG4	Bruhns et al, 2009; Anderson et al, 1990
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2	van Spriel et al, 1999
FcεRI	IgE	Daeron et al, 1994
CRI (CD35)	C1q, C4b, C3b, manóza vázající lektin	Ghiran et al, 2000
Integriny		
CR3 (αMβ2, CD11b/CD18, Mac-1)	IC3b, faktor X, faktor H, t-PA, fibrinogen, kininogen, fibronektin, kolageny, elastáza, plasminogen, ICAM, GPIb, denaturované proteiny	Ross et al, 1992; Yakubenko et al, 2002
CR4 (αXβ2, CD11c/CD18, gp150/95) α5β1 (VLA-5)	IC3b, fibrinogen, ICAM, denaturované proteiny, fibronektin, osteopontin	Humphries et al, 2009; Ross et al, 1992; Loike et al, 1991; Diamond et al, 1993; Davis, 1992; Humphries et al, 2009
PRRs		
Dectin-1 (CLEAC7A)	β1, 3-glukany	Brown et al, 2002
CD14	LPS-vázající protein	Schiff, 1997
Manózoový receptor (CD206)	manóza	Ezekowitz, 1990
BAL1	LPS	Das et al, 2011
Scavengerové receptory		
CD36	erythrocyty infikované <i>Plasmodium falciparum</i>	Patel et al, 2004
MARCO	bakterie	van der Laan et al, 1999
Scavenger receptor A (CD204)	LPS, LTA	Peiser et al, 2000; Thomas, 2000
Apoptické receptory mrtvých buněk		
PS receptory		
TIM-4	fosfatidylserin	Miyashita et al, 2007; Kobayashi et al, 2007
BAL1	fosfatidylserin	Park et al, 2007
Stabilin-2	fosfatidylserin	Park et al, 2008
CD300f	fosfatidylserin	Choi et al, 2012
TAM receptory		
LRPI (CD91)	Gas6, protein S	Nagata et al, 1996; Anderson et al, 2003
Integriny		
αVβ3	MFG-E8, Del-1, vitronectin, vWF, PECAM-1, tenascin, BSP, osteopontin, trombospondin, LAP-TGFβ, fibrinogen	Humphries et al, 2006; Savil et al, 1990; Hanayama et al, 2002
αVβ5	MFG-E8, Del-1, vitronectin, BSP, osteopontin	Humphries et al, 2006; Hanayama et al, 2002; Albert et al, 2000
Scavengerové receptory		
CD36	oxidované lipidy včetně PS a PC	Greenberg et al, 2006
SCARF-1	C1q opsonizovaný PS	Remiez-Ortiz et al, 2013

Obr. 7: Lidské fagocytární receptory (Freeman et al, 2014)

Obecně proces fagocytózy probíhá ve čtyřech krocích: aktivní pohyb fagocyty, adherence, ingesce a intracelulární degradace. Je znázorněn na obrázku 8.



Nature Reviews | Immunology

Obr. 8: Schematické znázornění fagocytózy (Underhill & Goodridge, 2012).

Fagocytóza je zahájena chemotaxí, kdy jsou buďto z poškozeného místa různými buňkami vyplavovány chemotraktanty v podobě chemokinů, nebo jsou chemoatraktanty přímo některé složky patogenů. Fagocyty migrují do místa se zvyšujícím se gradientem chemoatraktantů, na povrchu endotelií se zvyšuje se exprese adhezinů, fagocyty přilnou k vnitřnímu povrchu cévy a prostupují pomocí diapedézy její stěnou do tkání. Významnými chemoatraktanty fagocytů jsou formylpeptidy bakterií, C5a složka komplementu, Leukotrien B, PAF a cytokiny TNF- α a GM-CSF. Na neutrofile navíc působí ještě IL-8 a na monocyty TGF- β a chemokiny MIP, MCP a RANTES (Toman et al, 2009; Jílek, 2005).

V další fázi dochází k navázání částic na povrch fagocytu, které obvykle usnadňují opsonizace, při které se na fagocytovanou částici nalepí opsoniny, štěpy C3 složky komplementu nebo protilátka IgG, které se pak z druhé strany váží na receptory na fagocytu a tvoří tak jakýsi „fagocytární most.“ Složka C3b se váže na CR1 receptor pro komplement na membráně fagocytu, iC3b se váže na CR3 a IgG na receptor Fc γ R I, II nebo III (Toman et al, 2009). Významnými opsoniny jsou též proteiny akutní fáze jako je sérový lektin vázající manózu, fibronectin, fibrinogen, C-reaktivní protein a sérový

amyloid P (Hořejší & Bartůňková, 2005). Některé složky mikrobiálních buněk jako jsou lipopolisacharidy, peptidoglykany a vybrané sekvence nukleových kyselin se mohou vázat přímo na Toll-like receptory a lektinové receptory fagocytu, aktivovat jej a přímo tak indukovat fagocytózu i bez opsonizace (Jílek, 2005).

Kromě TLR zprostředkované fagocytózy má rozeznání PAMPs prostřednictvím TLRs ještě další úlohu. Nejenže spouští degradaci patogenů a následnou prezentaci jejich antigenů, rozpoznání patogenu vede též k expresi genů pro zánětlivé cytokiny a kostimulační molekuly. Bylo prokázáno, že když v buňce chybí TLR2/TLR4 nebo MyD88, běžný adaptor v TLR signalizaci, je fagocytóza bakterií včetně *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *staphylococcus aureus* narušena v důsledku narušení maturace fagozomu (Blander & Medzhitov, 2004). Některé studie navíc naznačují, že TLR zprostředkovaná MyD88 dependentní aktivace p38 je nutná k maturaci fagozomu (Blander & Medzhitov, 2004; Doyle et al, 2004). Dále byl zkoumán vliv prestimulace TLRs na fagocytózu *E. coli* DH5 α a *E. coli* K1 myšimi mikroglialními buňkami a přišlo se na to, že prestimulace TLRs fagocytózu výrazně zvyšuje (Ribes et al, 2009).

Receptory pro Fc fragment protilátek (Fc γ R I, II, III, Fc α R, Fc ϵ RI a Fc ϵ RII) fungují jako iontové kanály a v momentě, kdy se na ně protilátky naváží, se otevřou a do buňky mohou vstupovat sodíkové ionty. Dochází k membránové depolarizaci a uvolnění vápenatých iontů z intracelulárního prostoru. Tím se spouští mnoho dějů včetně oxidativního vzplanutí fagocytu (Toman et al, 2009).

Receptory pro komplement aktivují fagocyt až druhým signálem (cytokiny, fibronektin, kaminin aj.), přičemž se fosforyluje proteinkináza C. Po vazbě dochází k vychlívání membrány fagocytu v tzv. pseudopodie, které obklopují pohlcovanou částici. Pak dochází k úplnému oddělení části membrány, která uzavře fagocytovaný materiál do váčku zvaného fagozom (Toman et al, 2009). Jeden fagocyt je schopen během hodiny pohltnout stovky částic tuše, desítky bakterií či 2-8 kvasinek. Při ingesci dochází ke změně tvaru i vnitřního uspořádání buňky, což zajišťují hlavně tubuly cytoskeletu (Jílek, 2005).

Fáze degradace, neboli usmrcení pohlcených mikrobů, tzv. cidie, začíná tím, že fagozom se živými mikroby splývá s lysozomy za vzniku fagolyzozomu. Tentýž lysozom je schopen splývat opakovaně s více fagozomy. Ve fagolyzozomu dochází k digesci –

trávení pohlceného materiálu. Lyzozomy totiž obsahují mikrobicidní látky, které rozlišujeme do dvou skupin podle jejich působení (Jílek, 2005).

První skupina zahrnuje látky odvozené z kyslíkového metabolismu buňky, jako hydroxylový radikál, superoxid, singletový kyslík a peroxid vodíku. Tyto sloučeniny poškozují mikroby svými oxidativními účinky. Metabolity kyslíku dále mohou za přítomnosti enzymu myeloperoxidáza a chloridových iontů měnit aminokyseliny na jejich chloraminy, které mají též mikrobicidní účinky. Reaktivní kyslíkaté sloučeniny se tvoří až po aktivaci pohlceným materiálem, kdy buňka mnohonásobně zvýší tvorbu oxidantů, čemuž se říká metabolické oxidativní vzplanutí (nebo též respirační) (Hořejší & Bartůňková, 2005; Jílek, 2005).

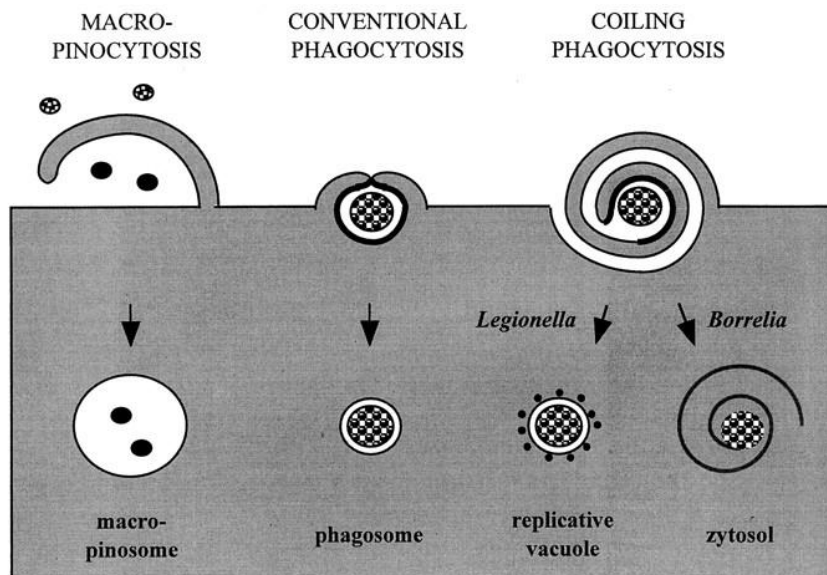
Druhá skupina baktericidních látek lyzozomu je na kyslíku nezávislá a látky, které do ní patří, mají různé mechanismy účinku. Sem řadíme například enzym lysozym, který rozpouští buněčnou stěnu grampozitivních bakterií, a laktoferin, který váže železo a odnímá ho mikrobům, kteří bez něj nemohou žít. Zajímavostí z této skupiny jsou tzv. defenziny, kationické bílkoviny, které se zanořují do buněčné membrány patogenů a vytvářejí v nich póry. Podobně působí i cathelicidiny (Jílek, 2005).

Lyzozomální enzymy jsou schopné štěpit nukleové kyseliny, nukleotidy, proteiny, lipidy i sacharidy (Toman, 2009). Usmrcené patogeny a ostatní částice a makromolekuly jsou ve fagocytu hydrolyzovány pomocí enzymů na nízkomolekulární fragmenty, z nichž většinu buňka uvolní, ale část se přesouvá do vezikul ER, kde jsou zachyceny MHCII, aby je buňka mohla prezentovat na svém povrchu (Jílek, 2005).

V rámci fagocytózy fagocyty produkují řadu cytokinů. Monocyty a makrofágy sekretují do svého okolí cytokiny IL-1 α , IL-1 β , IL-3, TNF, IL-8, IL-12 a GM-CSF. IL-1 a TNF- α podporují zánět a aktivují mnoho buněk imunitního systému. IL-1 je endogenní pyrogen způsobující horečku, čímž zvyšuje účinnost fagocytózy a dalších zánětlivých dějů. TNF α má prozánětlivý a protinádorový účinek. IL-12 má regulační funkci v diferenciaci pomocných T lymfocytů a prosazuje Th1 odpověď podporující specifické buněčné imunitní reakce na úkor odpovědi humorální (Jílek, 2005). Neutrofilové produkují méně cytokinů, ale je jich více v místě zánětu. Zprostředkují systémovou odpověď na zánět (IL-1, IL-6, TNF), amplifikují zánětlivou reakci (IL-8), regulují hematopoezu (IL-3, GM-CSF) a regulují diferenciaci T-lymfocytů (IL-12). Produkty eosinofilů jsou IL-5, MIP-1 α , ECP, TGF- α a TGF- β (Hořejší & Bartůňková, 2005).

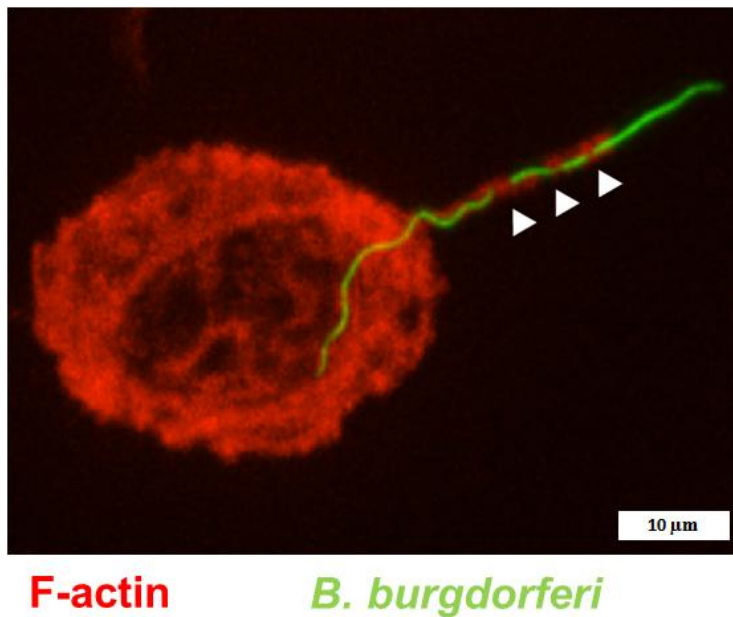
1.7.1 COILING FAGOCYTÓZA

Speciálním druhem fagocytózy je tzv. coiling fagocytóza (Obr. 6), která byla původně popsána u bakterie *Legionella pneumophila* (Horowitz, 1984). Zatímco u běžné fagocytózy fagocyt symetricky obklopí mikroorganismus a vytvoří okolo něj fagosomální membránu, při coiling fagocytóze dochází ke spirálovitému obtočení patogenu jedinou panožkou a vtažení celého komplexu do buňky (Rittig et al, 1999). V závislosti na druhu patogenu se panožkový kotouč (coil) přemění buď na replikativní vakuoly, na nichž jsou přisedlé ribozomy (Horowitz, 1984), nebo na zónu prostou organel (organelle exclusion zone) (Rittig et al, 1992). Morfologické rozdíly mezi mikropinocytózou, běžnou fagocytózou a coiling fagocytózou je vyobrazen na obrázku 9.



Obr. 9: Schematický náčrt morfologické charakteristiky makropinocytózy, konvenční fagocytózy a coiling fagocytózy (Rittig et al, 1998).

Tento nekonvenční způsob fagocytózy byl pozorován i u rodu *Candida* (McKinney et al, 1977), bičíkovce *Trypanosoma brucei* (Stevens & Moulton, 1987) a promastigotů *Leishmania donovani* (Chang, 1979). Bylo prokázáno, že profesionální fagocyty takto pohlcují i spirochety *Borrelie burgdorferi* (Rittig et al, 1998; Rittig et al, 1992). Zdá se dokonce, že coiling fagocytóza je při pohlcování *B. burgdorferi* preferována před fagocytózou konvenční (Rittig et al, 1992). Fotografie coiling fagocytózy borelie z konfokálního mikroskopu je na obrázku 10.



Obr. 10: Fotografie z konfokálního mikroskopu znázorňující coiling fagocytózu *B. burgdorferi* lidským makrofágem (barvení: F-actin – RPF-Lifeact; *B. burgdorferi* – GFP) (Linderlab.de).

1.7.2 FAGOCYTÓZA DENDRITICKÝCH BUNĚK

Fagocytóza u dendritických buněk má své charakteristické znaky. Oproti ostatním fagocytům jejich hlavním úkolem není bezprostřední odstraňování patogenů, nýbrž prezentace jejich antigenů ostatním buňkám.

Dendritické buňky po pohlcení fagocytovaných částic maturují v závislosti na typu maturačního signálu, tj. druhu patogenu (či mrtvé buňky aj.) a tkáni, ve které se buňka s fagocytovaným materiálem setkala. Nezralé DCs exprimují velké množství fagocytárních receptorů, včetně lektinů, scavengerových receptorů a patogen-specifických receptorů (Banchereau et al, 2000). Oproti ostatním fagocytům, které jsou schopné fagocytovat opakovaně, DCs maturačním procesem schopnost fagocytózy ztrácejí kvůli změnám aktivity Rac a Cdc42 (Nobes & Marsh, 2002). DCs jsou též schopné tzv. zkřížené prezentace, při které prezentují exogenní antigeny s MHCI, což bývá mnohdy nutné k cytotoxické odpovědi proti bakteriím, nádorům, některým virům a zároveň i k toleranci vlastních buněk (Rock et al, 1990; Heath et al, 2004).

Degradace ve fagozomu DCs je přísně regulována. Fagozomy DCs obsahují hlavně endopeptidázy, exopeptidázy, esterázy a reduktázy (Riese & Chapman, 2000; Maric et al, 2001). Nejvíce obsahuje cysteinových proteáz (katepsin S, B, H a L), asparátových proteáz (katepsin D a E) a asparginové endopeptidázy (AEP) (Lennon-Dumenil et al, 2002; Honey & Rudensky, 2003). Schopnost fagozomální degradace DCs je ovšem i přes velké množství enzymů oproti degradaci v makrofázích nízká (Delamarre et al, 2005). To může být způsobeno nižším množstvím AEP, katepsinu S, D, L a B oproti makrofágům (Delamarre et al, 2005), ale též přísnou kontrolou pH fagozomu, které prvních pár hodin fagocytózy zůstává téměř neutrální (Savina et al, 2006). Bylo též dokázáno, že proteázy v DCs neslouží pouze k fagozomálnímu rozkladu. Katepsin S, AEP a cystatin C kontrolují zpracování Ii řetězce, čímž mají vliv na intracelulární transport MHCII a prezentaci antigenu CD4⁺ T lymfocytům (Driessen et al, 1999; Manoury et al, 2003; Pierre & Mellman, 1998).

Snížená fagozomální degradace oproti ostatním fagocytům může být vysvětlena právě tím, že úkolem DCs je spíše prezentace antigenu, než odstraňování patogenů. Pro zdárnou prezentaci je totiž nutné, aby nebyl materiál degradován příliš a nedošlo tak ke ztrátě cenných epitopů pro T lymfocyty.

1.8 ÚNIK BORÉLIE IMUNITNÍMU SYSTÉMU

Během sání klíštěte borelie infikují hostitele, což vyvolává silnou nespecifickou i specifickou imunitní odpověď. Aby se borelie chránily před útokem imunitního systému, vyvinulo se u nich mnoho způsobů, jak imunitní reakci potlačit, nebo obejít. Mezi ně patří například inhibice komplementu, antigenní variabilita, vázání protilátek rozpustnými antigeny a další.

První z překážek, které musí borelie v těle hostitele překonat, je opsonizace patogenu komplementovým systémem. Alternativní dráha aktivace komplementu (přirozená imunita) používá specifických proteinů a jejich rozštěpených produktů k přivolání fagocytů a zároveň rozkládá buněčnou membránu infekčních agens. Buňky hostitelského organismu mají na svém povrchu buď regulátory aktivace komplementu, nebo jsou schopny vázat komplement-inhibiční faktory a vyhýbají se tak destrukci komplementem. Mnoho bakterií používá podobných mechanismů. *B. burgdorferi* váže

faktor H a/nebo FHL-1/reconnectin proteiny rodinou povrchových lipoproteinů (OspE, p21, ErpA, a ErpP) (Hellwage et al, 2001; Alitalo et al, 2002), jimiž na svůj buněčný povrch připoutá hostitelské proteiny a je tak rozpoznávána jako vlastní buňka. U *B. burgdorferi* byly pozorovány ještě další podobné proteiny, nazvané BbCRASP-1, BbCRASP-2 a BbCRASP-3 (Kraiczy et al, 2003; Kraiczy et al 2001b). Ačkoliv rezistence ke komplementu nebyla prokázána jako přímý důsledek vázání H faktoru, rezistence a citlivost na sérum u tří genotypů *B. burgdorferi* sensu lato (*B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto) byla vždy spojena s druhý vázající faktor H (Kraiczy et al, 2001a; Kraiczy et al, 2001b). Mechanismus rezistence ke komplementu pravděpodobně spočívá v inaktivaci hlavního komponentu komplementární kaskády, C3b, která byla pozorována jak u k séru rezistentním kmenů, tak u kmenů, které jsou k séru citlivé (Alitalo et al, 2001). Některé studie naznačují, že *B. burgdorferi* možná produkuje protein, který napodobuje rozšířený regulátor aktivace komplementu hostitele – CD59, který zabraňuje vytvoření membrány atakujícího komplexu (MAC), který je posledním krokem komplementem-mediované buněčné destrukce (Pausa et al, 2003).

B. burgdorferi je též schopná potlačit buňkami-zprostředkovanou imunitní reakci. Příkladem je její schopnost stimulovat svými lipoproteiny lymfocyty a monocyty/makrofágy k produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Giambartolomei et al, 1998; Murthy et al, 2000).

Borelie jsou též schopny vázat hostitelské protilátky vypouštěním rozpustných antigenů, které pak s protilátkami tvoří imunokomplexy (protilátka:antigen). Takto mohou zabránit opsonizaci protilátkami (Schutzer et al, 1990; Coyle et al, 1990).

Mezi významné způsoby úniku borelie před imunitním systémem hostitele patří změna povrchových proteinů. Antigenní variabilita těchto proteinů je velice podobná VSG (variable surface glycoprotein) trypanosom, který jim pomáhá obejít imunitní systém hostitele. Poprvé byly geny antigenní variace identifikovány u *B. hermsii* a označeny jako *vmp* – variable membrane protein (Plaster et al, 1985). Mechanismem celého jevu je, že když na borelie zaútočí protilátky hostitelského imunitního systému, patogen se promění, vytvoří jiné povrchové antigeny a před protilátkami se ukryje. Hlavní antigenní variací prochází protein OspE (Sung et al, 2000), k obcházení hostitelské imunity je však použito i snížení exprese dalších povrchových proteinů – OspC a OspA (Xu et al, 2006).

Proti toxickým sloučeninám kyslíku a dusíku, které jsou tvořeny hostitelem jako reakce na průnik bakterie do těla, se může borelie bránit aktivací stresových genů pro produkci enzymů, čímž se chrání před oxidací (Boylan et al, 2003).

B. burgdorferi též vypouští lipozomální váčky zvané blebs, do kterých jsou začleněny antigeny OspA, OspB, OspD a protein p100. Blebs mají afinitu k endotelovým buňkám a nejspíše boreliím napomáhají přežít v oběhovém systému. *In vitro* pokusy naznačují, že by mohly být i začleněny do cytosolu a jádra dendritických buněk, lymfocytů a fibroblastů, což by vedlo k tvorbě CD-8-pozitivních T-lymfocytů, které by pak mohly zabíjet vlastní buňky a byly by tak zodpovědné za výskyt autoimunitních reakcí. Tato teorie však zůstává nepotvrzena (Beermann et al, 2000).

Vlivem penicilinu se může *B. burgdorferi* přeměnit na cystickou formu (Preac Mursic et al, 1996), která je odolnější, a zase z cystické formy se umí proměnit zpět v pohyblivou spirochetu. Cysty jsou pokryty VlsE (variable lipoprotein surface-exposed) a OspA proteiny, mají minimálně 20 nových antigenů (Alban et al, 2000).

1.9 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HOSTITELE

Aby bylo umožněno sání klíštěte na hostiteli, musí klíštět rozrušit pokožku a vytvořit ránu zásobenou krví. K tomu je zapotřebí zastavit krevní srážení a vyhnout se imunitní reakci hostitele. Během koevoluce se svými hostiteli si klíšťata vyvinula mnoho mechanismů, jak obejít jejich hemostatickou a imunitní bariéru. Těchto mechanismů pak dále využívají borelie, které se spolu se slinami dostávají do krevního oběhu hostitele. Uvedu tedy některé příklady účinku slin a některých molekul, které se v nich nachází.

Sliny klíšťat obsahují směs vazodilatačních, protizánětlivých, antikoagulačních a imonomodulačních molekul (Ribeiro et al, 1985; Hovius et al, 2007). Sliny mnoha druhů klíšťat inhibují řadu funkcí imunitního systému včetně aktivace komplementového systému (Ribeiro, 1987), fagocytózy a destrukce patogenů (Ribeiro et al, 1990; Kuthejlov et al, 2001), produkce prozánětlivých cytokinů (Ramachandra & Wikel, 1992), aktivity NK buněk (Kopecký & Kuthejlov, 1998) a proliferace T a B-lymfocytů (Hannier, 2003). Bylo také zjištěno, že klíštěcí sliny odklání imunitní systém k odpovědi typu Th2, která je charakterizována vysokou produkcí cytokinů IL4 a IL10, a nízkou produkcí cytokinů

INF γ a IL12 (Ferreira & Sliva, 1999; Schoeler et al, 1999; Christe et al, 1999; Mejri et al, 2001).

První překážkou, kterou musí klíšťata při sání na hostiteli překonat, je hemostatická bariéra. Vlivem srážlivosti krve by obvykle došlo k zastavení krvácení a znemožnění sání. Proto klíštěcí sliny obsahují mnoho látek, díky nimž tento problém překonávají. Sliny obsahují antikoagulanty, které inhibují faktor Xa nebo trombin (Wikel, 1996). Například ve slinách klíštěte *I. scapularis* byl objeven protein Ixolaris, který inhibuje aktivaci faktoru X přes tkáňový faktor a faktor VIIa (Francischetti et al, 2002) a Salp14 inhibující faktor Xa (Narasimhan et al, 2002). Proti shlukování krevních destiček se ve slinách nachází apyráza, která hydrolyzuje ADP a ATP na AMP (Ribeiro et al, 1991), disagregin (Karczewski et al, 1994), variabilin (Wang et al, 1996) či prostaglandiny a integriny bránící vazbě fibrinogenu na krevní destičky (Ribeiro et al, 1988).

Klíštěcí sliny také obsahují látky blokující účinky histaminu a serotoninu z granul bazofilů a žírných buněk (Paesen et al, 1999). Jsou jimi histamin vázající proteiny (HBP). Sliny *Rhipicephalus appendiculatus* obsahují lipocaliny vázající pouze histamin, zatímco sliny *Demacentor reticularis* v sobě mají homologní protein, který váže histamin i serotonin (Paesen et al, 2000). Klíště *I. scapularis* naopak zvolilo jinou cestu a spolu se slinami vypouští do rány histamin uvolňující faktor tHRF (tick histamine release factor), který se váže na bazofily a nutí je k uvolnění histaminu. Následkem toho se zvýší propustnost cév a přítok krve do rány, což usnadňuje sání klíštěte (Dai et al, 2010).

Klíšťata si také vyvinula látky, díky nimž jsou schopné sát na hostiteli několik dní, aniž by je imunitní systém zaregistroval. Takovými látkami jsou například evasiny, proteiny, které se váží na chemokiny a neutralizují je, takže pod jejich vlivem nedojde k aktivaci buněk nespecifické imunity (Déruaz, 2008).

Vzhledem ke skutečnosti, že se v práci zabývám dendritickými buňkami, uvedu několik molekul z klíštěcích slin, které nějakým způsobem ovlivňují funkci DCs.

Bylo dokázáno, že imunopresivní efekt klíštěcích slin je využíván klíšťaty přenášenými patogeny. Tento efekt se nazývá SAT (saliva-activated transmission) (Nuttall & Labuda, 2004). Hlavním prokázaným SAT faktorem je Salp15, imunomodulační protein ze slin *Ixodes scapularis*, který se váže na povrch borelií, chrání je před

protilátkami a komplementem, a inhibuje T lymfocyty a DCs (Anguita et al, 2002; Ramamoorthi et al, 2005).

Protein Iris z *I. ricinus* inhibuje $\text{INF}\gamma$, IL-6 a IL-8, snižuje produkci $\text{TNF}\alpha$ makrofágy, je inhibitorem serinových proteáz a má antihemostatické účinky (Leboulle et al, 2002; Prevot et al, 2006; Prevot et al, 2009).

Jako další imunomodulační látky klíštěcích sliny byly označeny PGE2 a sialostatin L (SialoL) z *I. scapularis*. PGE2 váže IL-2 a blokuje tak jeho účinek. SialoL inhibuje cysteinovou proteázu – má vysokou afinitu ke katepsinu L a částečnou ke katepsinu C (Sá-Nues et al, 2009). Vazba na katepsin S uvnitř DCs vede k narušení a ztížení finálního zpracování antigenu a tvorbě komplexů s MHCII. Tím SialoL inhibuje maturaci DCs způsobenou patogeny a vede k inhibici proliferace antigen specifických T lymfocytů (Sá-Nues et al, 2009). Inhibicí cysteinových proteáz dochází k inhibici aktivace serinových proteáz v granulech cytotoxických lymfocytů (CTL), NK buněk, žírných buněk a neutrofilů. Také potlačuje proliferaci CTL a migraci neutrofilů (Horká et al, 2011; Kotsyfakis et al, 2006; Sá-Nunes et al, 2009). SialoL potlačuje produkci IL-9 Th9 lymfocyty a má protizánětlivé účinky. Příbuzný sialostatin, označovaný SialoL2 podporuje in vivo přenos *B. burgdorferi* (Kotsyfakis et al, 2010) a inhibuje kaspázou 1 mediovaný zánět při infekci *Anaplasma phagocytophilum* (Chen et al, 2014). Potlačuje také signalizaci INF - narušuje signální transdukcii spouštěnou interferonem snížením fosorylace STAT-1/2 proteinů, a tím negativně ovlivňuje $\text{INF-}\beta$ zprostředkovanou indukci tzv. ISG-interferonem stimulovaných genů v buňkách stimulovaných LPS a podporuje replikaci viru TBE v DCs in vitro (Lieskovská et al, 2015).

Japanin, lipocalin z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, má velice zajímavé účinky na dendritické buňky. Bylo dokázáno, že se k DCs specificky váže a moduluje jejich maturaci. Přidáním japaninu do kultury lidských DCs dochází ke snížení upregulace CD86 a CD83 po stimulaci LPS a snížení produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a $\text{TNF}\alpha$. Zároveň japanin zvyšuje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 a expresi ko-inhibiční molekuly CD274. Maturaci DCs však nebrání úplně - nemá vliv na expresi MHCII a kostimulační molekuly CD40. Dalším jeho efektem je inhibice diferenciaci monocytů na dendritické buňky (Preston et al, 2013).

Aktivaci B lymfocytů během počáteční fáze může negativně ovlivnit B-cell inhibitory protein z *I. ricinus* (Hannier et al, 2004). Produkci kyslíkových radikálů neutrofilů zase inhibují proteiny ISL 929 a ISL 1374 (Guo et al, 2009).

Jednou z nejdůležitějších vlastností klíštěcích slin je jejich schopnost inhibovat proliferaci T-lymfocytů a produkci Th1 cytokinů jako jsou $\text{INF}\gamma$ a IL-2. Salp15 ve slinách klíštěte ovlivňuje funkci DCs (Zajkowska et al, 2012; Hovius et al, 2008), což nepřímo potlačuje aktivaci T lymfocytů (Dai et al, 2009). Salp15 ovlivňuje DC-SIGN receptor na DCs, což vede ke snížení produkce prožánětlivých cytokinů (IL-12, IL-6, $\text{TNF}\alpha$), které jsou nutné pro aktivaci T lymfocytů v lymfatických uzlinách, a přímo váže CD4 receptory lymfocytů, a tak je v místě zánětu inhibuje. Podobně také snižuje sekreci IL12p70, IL6 a $\text{TNF}\alpha$ DCs v reakci na LPS.

Jedním nedávno charakterizovaným proteinem je IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin-2) nacházející se ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*. IRS-2 inhibuje chymotrypsinu podobné serinové proteázy katepsin G a chymázu. Katepsin G produkují aktivované neutrofilové buňky, chymázu produkují žírné buňky a oba enzymy jsou významnou součástí zánětlivé odpovědi. Katepsin G je navíc zapojen v buněčné signalizaci, která vede k aktivaci a agregaci destiček. Shlukování destiček je tímto způsobem IRS-2 ovlivněno. Dalšími schopnostmi IRS-2 je inhibice trombinu, následkem čehož vede k potlačení shlukování destiček. Při uměle vyvolaném zánětu u myši též vyvolává inhibici otoku a snížení migrace neutrofilů do zánětlivé tkáně (Chmelař et al, 2010). IRS-2 rovněž potlačuje diferenciaci Th17 buněk potlačením IL-6/STAT-3 signální dráhy (Páleníková et al, 2015).

Pozorování též ukázala, že vystavení DCs klíštěcím slinám *in vitro* snižuje jejich maturaci na základě CD40, TLR9, TLR3 a TLR7 ligace, stejně tak jako snižuje prezentaci antigenu. Přidáním klíštěcích slin *in vivo* byla pak signifikantně snížena maturace a časná migrace DCs z kůže do lymfatických uzlin, stejně tak jako schopnost DCs lymfatických uzlin prezentovat rozpustné antigeny specifickým T lymfocytům. DCs vystavené klíštěcím slinám selhaly v navození účinné Th1 a Th17 polarizace a prosazovaly Th2 odpověď (Skallová et al, 2008).

2 CÍLE PRÁCE

- 1. Vliv klišťecích slin na produkci cytokinů a chemokinů dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi**
- 2. Vliv klišťecích slin na fagocytózu borelií dendritickými buňkami**
- 3. Vliv klišťecích slin na expresi genů dendritických buněk účastnících se fagocytózy**

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 MATERIÁL

3.1.1 MYŠI

V pokusech byly použity samice imbredních myši kmene C57BL/6 (AnLab) ve stáří šesti až osmi týdnů. Myši byly použity k izolaci kostní dřevě a následné derivaci dendritických buněk. Byly chovány v bariérovém chovu zvířince katedry Medicínské biologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.2 KLÍŠŤATA A SLINY

Dospělé samičky klíšťat *Ixodes ricinus* nachytané vlajkovou metodou v okolí města České Budějovice byly ponechány sát na morčatech 6-7 dní. Nasátá klíšťata omytá v 15% etanolu byla připevněna na podložní sklíčka, na které se modelínou upevnila kapilára, která se klíštěti nasadila na hypostom. Na hřbet klíštěte se nakapalo a rozetřelo 1-2 μ l (v závislosti na velikosti klíštěte) roztoku pilocarpinu (2,5mg pilocarpinu/150ml etanolu) k vyvolání slintání.

Podložní sklíčka s klíšťaty byla uložena do krabiček na vlhkém filtračním papíru a uložena do CO₂ termostatu o teplotě 34°C. Kapiláry byly průběžně kontrolovány, nejdéle po dvou hodinách se všechny kapiláry odebraly a jejich obsah byl vyprázdněn do ependorfky na ledu. Takto získané sliny se přefiltrovaly přes 0,22 μ m (Millex-GV) filtr a změřila se u nich koncentrace celkové bílkoviny podle Bradfordové (Bradford, 1976). Takto získané sliny byly skladovány při -70°C pro další použití.

3.1.3 BORELIE

V pokusech byly použity spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ATCC) a *Borrelia burgdorferi* 297-GFP laskavě poskytnuté Dr. J. Randolfem pěstované v Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK-H) mediu (Sigma) s 6% králičím sérem při 34°C. Před použitím byly borelie spočítány dle Magnusona (Magnuson et al, 1948). Na podložní sklíčko bylo nanášeno 3,5 μ l boreliové suspenze a překryto krycím sklem o rozměrech 18 \times 18mm. Poté byl v temném poli optického mikroskopu (zvětšení 400 \times) určen počet borelií v 20-ti zorných polích. Výsledný počet borelií v 1ml byl pak vypočítán podle vzorce:

počet bor./ml=a*ředění *5,01*10⁵

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

Následně bylo odebráno potřebné množství suspenze, která byla centrifugována při 8000g 15 minut. Stočené borelie byly rozsuspendovány v závislosti na dalším postupu.

3.1.4 REKOMBINANTNÍ PROTEIN IRS-2

Rekombinantní protein IRS-2 byl laskavě poskytnut RNDr. J. Chmelařem, PhD.

3.2 METODY

3.2.1 MĚŘENÍ PRODUKCE CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI

Materiál: BMDC médium – RPMI (Biowest) + 10% telecí fetální sérum (Biowest) + 50 µM 2-ME (Sigma-Aldrich) + 100 µg/mL penicilin (Biowest) + 100 U/mL streptomycin (Biowest) + 2 mM glutamin (Biowest) + 30 ng/ml GM-CSF (PeproTech)

MEM (Biowest) – Minimal Essential Medium

Kompletní PRMI - RPMI (Biowest) + 10% telecí fetální sérum (Biowest) + 50 µM 2-ME (Sigma-Aldrich) + 100 µg/mL penicilin (Biowest) + 100 U/mL streptomycin (Biowest) + 2 mM glutamin (Biowest)

PBS; izopropanol; 0,84% NH₄Cl

Certifikovaná destička Costar

Array firmy R & D Systems

ELISA kity firmy eBioscience

ELISA kity firmy PeproTech

3.2.1.1 Izolace kostní dřeně a derivace BMDC

Myš byla usmrcena zlomením vazů. Kostní dřeň byla izolována z holenních a stehenních kostí a rozsuspendována v MEM (Minimal Essential Medium). Suspenze se

přefiltrovala přes 70 µm BD filtr (Corning, 70 µm nylon) a stočila na centrifuze (10 min, 170g). Lýza erytrocytů se iniciovala přidáním 2ml 0,84% NH₄Cl ohřátého na 37°C. Po 2 minutách se lýza zastavila přidáním 10ml MEM. Buňky se spočítaly v Bürkerově komůrce, stočily a naředily v BMDC médiu na koncentraci 2,5×10⁶/10 ml. Buněčná suspenze se rozdělila do bakteriálních Petriho misek (10ml na misku) a kultivovala se v CO₂ termostatu s 5% CO₂ při 37°C.

Médium se buňkám měnilo 3. den, kdy se pouze přidalo 10ml čerstvého média, a podle druhu pokusu ještě 6. den, kdy se odebralo 10ml starého média a přidalo 10ml čerstvého. Osmý den se buňky sesbíraly lehkým opláchnutím proudem média a byly nasazeny na experiment. V případech, kdy se sledovala fagocytóza, byly buňky nasazeny na experiment 6. den.

3.2.1.2 Design pokusu a aktivace DC

Buňky se derivovaly 8 dní podle postupu v 3.2.1.2. Poté byly dendritické buňky naneseny na 96-jamkovou kultivační destičku (TPP) v objemu 200µl na jamku v kompletním RPMI médiu v případě metody ELISA a na 6-jamkovou kultivační destičku (TPP) v objemu 2 ml na jamku v kompletním RPMI médiu v případě cytokinové arraye. Výsledná koncentrace buněk byla 1×10⁶/ml. Buňky byly inkubovány 24 hodin při 37°C s 5% CO₂.

Samotná aktivace probíhala druhý den. K buňkám se přidali jednotlivé aktivátory podle následujícího schématu:

Ke skupině, u které se zkoumal vliv proteinu IRS-2, byl protein přidán o výsledné koncentraci 6µM s následnou inkubací 2 hodiny.

Ke skupině, u které se zkoumal vliv klíštěcích slin, byly sliny přidány o výsledné koncentraci 01 µg/ml s následnou inkubací 4 hodiny.

Ke všem skupinám, kromě skupiny negativní kontroly, byly po inkubaci přidány borelie, které byly resuspendovány v kompletním RPMI a přidány v objemu 10µl k buňkám. Počet borelií byl 10 spirochet na 1 buňku (2 mil. spirochét/200 tis. buněk/j.). Z buněk byl po 24 hodinách odebrán supernatant a dále analyzován.

3.2.1.3 Proteome Profiler – Mouse Cytokine Array Panel A

Pro stanovení relativního množství cytokinů a chemokinů byla použita Array firmy R&D Systems - Proteome Profiler – Mouse Cytokine Array Panel A. Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Metoda byla založena na principu imunodetekce. Chemiluminiscenční signál na membránách byl snímán v přístroji ChemiDoc MP firmy Bio-Rad a data byla zpracována v programu Image Lab Software.

3.2.1.4 Cytokinová ELISA

Pro stanovení absolutní koncentrace cytokinů byly použity Ready-Set-GO! ELISA Kity (e-Bioscience). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních destičkách (Costar), postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Supernatant byl testován na cytokiny IL-1- α , IL-6, IL-10 a TNF- α . Pokus byl prováděn v triplikátech. Absorbance byla měřena na vertikálním spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader, BioTek) při 450nm pomocí programu Gen5.

3.2.1.5 Chemokinová ELISA

Pro stanovení absolutní koncentrace chemokinů byly použity kity firmy PeproTech – Murine MIP-1 β Mini ELISA Development Kit, Murine MIP-2 Mini ELISA Development Kit, Murine JE(MCP-1) Mini ELISA Development Kit a IL-1ra Quantikine ELISA kit od firmy R&D. Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních destičkách (Costar), postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. K dokončení reakce byl použit substrát TMB (eBioscience). Pokus byl prováděn v triplikátech. Absorbance byla měřena na vertikálním spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader, BioTek) při 450nm pomocí programu Gen5.

3.2.1.6 Statistické vyhodnocení dat

Všechny pokusy byly prováděny v triplikátech. Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno v programu GraphPad Prism pomocí jednocestné analýzy variance a Tukeyho Post Hoc testu. 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).

3.2.2 MĚŘENÍ FAGOCYTÓZY BORELIÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

3.2.2.1 Design pokusu

Pro tento pokus byly použity buňky vyderivované podle postupu v 3.2.1.2. K buňkám byly přidány eFluor670 (eBioscience) značené borelie ATCC nebo borelie GFP a byla zkoumána jejich fagocytóza v časových intervalech 10 min, 30 min a 60 min.

3.2.2.2 Příprava buněk

Buňky byly po šesti dnech derivace nasazeny na U-panel (Nunc) v kompletním RPMI médiu s 5ng/ml GM-CSF v koncentraci 100 000 buněk/100 μ l.

Buňky byly rozděleny do 4 skupin:

- A. pro zkoumání adheze borelií držené při 4°C bez slin
- B. pro zkoumání adheze borelií držené při 4°C se slinami
- C. fagocytující bez slin
- D. fagocytující se slinami

Dvě skupiny (B, D) byly nejdříve preinkubovány s klíštěcími slinami (10 μ g/ml) po dobu 4 hodin v CO₂ termostatu při 37°C. Poté se všechny skupiny na 15 minut nechaly vychladit na 4°C a byly k nim přidány borelie. Po přidání borelií (GFP nebo ATCC značené eFluor 670) se buňky dále chladily při 4°C. Po uplynutí 30 minut se skupiny C a D přesunuly do 37°C CO₂ termostatu, kde mohlo docházet k fagocytóze, skupiny A a B byly ponechány ve 4°C. Po uplynutí časových intervalů (10 min, 30 min a 60 min) byly buňky dvakrát promyty v PBS s 1% BOFES (2 min, 500g) a obarveny FACS protilátkami s fluorochromem. Poté byly buňky dvakrát promyty (2 min, 500g) a byla měřena fagocytóza.

3.2.2.3 Příprava GFP borelií a borelií značených eFluor 670

I. GFP borelie byly spočítány a potřebné množství suspenze bylo stočeno při 8000 g po dobu 15 minut. Pelet borelií byl rozsuspendován v PBS s 1% BOFES a přidán v objemu 10 μ l k buňkám. Počet borelií byl 10 spirochet na 1 buňku (1 mil. spirochet/100 tis. buněk/j.).

II. ATCC borelie byly spočítány a potřebné množství suspenze bylo stočeno při 8000g po dobu 15 min. Borelie byly následně dvakrát promyty PBS (stočeny při

8000g, 15 min). Poté byly borelie naředěny dvojnásobnou koncentrací finální koncentrace v PBS. Byl připraven 10 μ M roztok Cell Proliferation Dye eFluor 670 (eBioscience) v PBS, který se smíchal 1:1 s připravenými boreliemi a vše bylo pečlivě promícháno. Následovala inkubace na třepačce při 37°C ve tmě 10 minut. Barvení bylo zastaveno přidáním pětinasobného množství kompletního média s 10% BOFES. Roztok byl pak inkubován na ledu po dobu 5 min. Borelie poté byly třikrát promyty PBS s 1% BOFES a naředěny v PBS s 1% BOFES na koncentraci 1×10^6 borelií v 10 μ l PBS s 1% BOFES. Takto připravené borelie byly hned použity.

3.2.2.4 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 BMDC buňky (získané podle postupu v 3.2.1.2.) - neznačené, značené CD11c (1 μ l/100 μ l) (e-Bioscience) a značené propidium jodidem (PI) (1 μ l/ml) (Sigma). Pomocí CD11c protilátky značené PE byla vybrána populace dendritických buněk, pomocí MHCII protilátky značené Alexa 700 bylo zjišťováno, kolik % buněk je maturovaných. PI pak byla ověřena životnost buněk. Data byla zpracována v programu Diva Software 4.

Tabulka 1: Nastavení cytometru.

	Napětí na detektorech (V):
FSC	230
SSC	380
FITC (GFP)	400
PE (CD11c)	450
PE-TexasRed (PI)	550
APC (eFluor 670)	550
Alexa 700 (MHCII)	600
<i>Window extension</i>	7

3.2.2.5 Statistické vyhodnocení dat

Všechny pokusy byly prováděny v triplikátech. Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno v programu GraphPad Prism pomocí dvoucestné analýzy variance a

Bonferroniho post-testu. 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).

3.2.3 EXPRESE GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZY V DENDRITICKÝCH BUŇKÁCH

Materiál: Kompletní RPMI - RPMI (Biowest) + 10% telecí fetální sérum (Biowest) + 50 μM 2-ME (Sigma-Aldrich) + 100 $\mu\text{g/mL}$ penicilin (Biowest) + 100 U/mL streptomycin (Biowest) + 2 mM glutamin (Biowest)
NucleoSpin RNAII Kit (Macherey-Nagel)
RT² First Strand Kit (Qiagen)
ProtoScript II – First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB - New England BioLabs)
RT² Profiler PCR Array Mouse Phagocytosis (Qiagen)
Fast Start Universal Probe Master (Rox) (Roche)
Taq Man Gene Expression Assays – Ceacam, β -actin (Applied Biosystems)

3.2.3.1 Design pokusu

Pro tento pokus byly použity buňky derivované 8 dní podle postupu v 3.2.1.2. Poté byly dendritické buňky naneseny na 6-jamkovou kultivační destičku v objemu 2ml v kompletním RPMI. Výsledná koncentrace buněk byla $2 \times 10^6/\text{ml}$. Buňky byly inkubovány 24 hodin při 37°C s 5% CO_2 . Buňky byly aktivovány stejně jako v 3.2.1.2., avšak inkubace probíhala 12 hodin. Po 12-ti hodinách se buňky stočily 10 min 500g a byla z nich izolována RNA.

3.2.3.2 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí Nucleic Spin RNA II kitu (Macherey-Nagel). Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Kvalita a množství vyizolované RNA bylo změřeno na přístroji Nanophotometer P330 firmy Implen. Koncentrace RNA dosahovala hodnot od 100 ng/ μl do 200ng/ μl . Následně byla RNA převedena na cDNA.

3.2.3.3 Příprava cDNA

Vyizolovaná RNA byla podle potřeby zakoncentrována ve Speedvacu (Thermo Scientific). Pro potřeby arraye byla převedena na cDNA pomocí RT2 First Strand kitu (Qiagen) v totálním množství 0,8 µg a pro potřeby běžné qPCR byla převedena na cDNA pomocí ProtoScript II – First Strand cDNA Synthesis kitu (NEB) v totálním množství 1 µg. Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Vzorky byly hned použity k real-time PCR.

3.2.3.4 qPCR Array – RT² Profiler PCR Array

Pro měření vlivu klíčících slin na snížení či zvýšení exprese genů dendritických buněk účastnících se fagocytózy byla použita RT² Profiler PCR Array Mouse Phagocytosis (Qiagen). Postup byl prováděn dle návodu dodaného výrobcem. Amplifikace probíhala v přístroji PCR cycler Rotor Gene 6000 (Corbett Research). Data byla zpracována podle návodu dodaného výrobcem a zanalyzována v internetovém programu výrobce (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism.

3.2.3.5 qPCR

Pro potvrzení výsledků zvýšení či snížení exprese genů z arraye byla provedená běžná qPCR. Zjišťovala se exprese genu pro Ceacam pomocí TaqMan Gene Expression kitu (Applied Biosystems), který obsahoval specifické primery pro Ceacam3 i sondu pro hledaný úsek. Reakční objem byl 20 µl: 18µl reakční směsi + 2µl cDNA. Proběhlo 40 cyklů při anealling teplotě 60°C.

Složení reakční směsi (18µl):

10µl FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche)

1µl TaqMan Gene Expression kit (Applied Biosystems)

7µl MiliQ H₂O

Jako referenční gen byl použit β-aktin. Amplifikace probíhala v přístroji PCR cycler Rotor Gene 6000 (Corbett Research). Pro každý vzorek byla reakce prováděna v triplikátech.

Výsledná relativní hodnota exprese genů byla vypočítána srovnávací C_T metodou (Livak & Schmittgen, 2001) z následujícího vzorce:

$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_T \text{ genu sledovaného cytokinu} - C_T \text{ referenčního genu } (\beta\text{-aktin}))$
stimulovaný vzorek - $(C_T \text{ genu sledovaného cytokinu} - C_T \text{ referenčního genu } (\beta\text{-aktin}))$
kontrolní nestimulovaný vzorek], kde C_T představuje cyklus, ve kterém fluorescenční
signál překročí tzv. threshold.

4 VÝSLEDKY

4.1 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA PRODUKCI CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI

4.1.1 Stanovení relativního množství cytokinů a chemokinů pomocí Mouse Cytokine Array Panel A

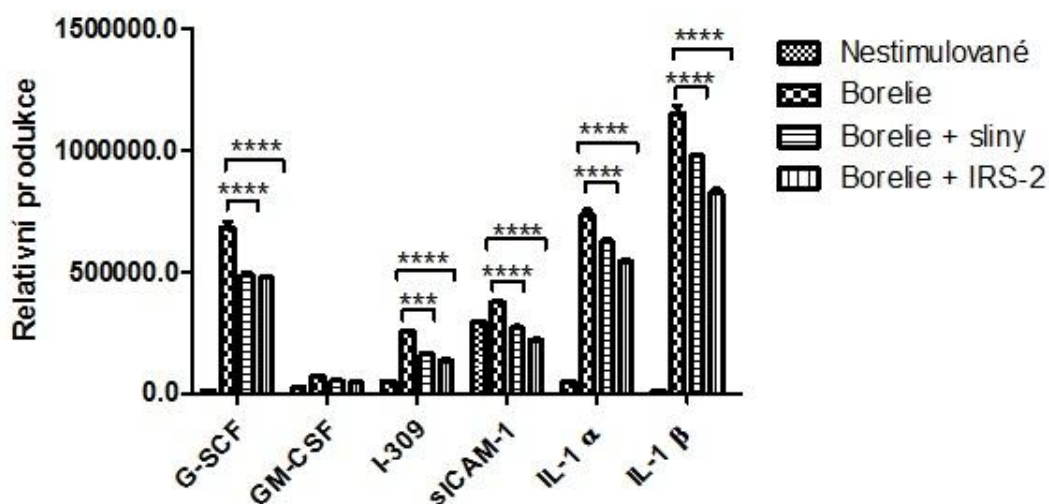
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv klíštěcích slin a rekombinantního klíštěcího proteinu IRS-2 na relativní produkci cytokinů a chemokinů dendritickými buňkami, které byly aktivovány boreliemi. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.1.4.

V arrayi byla zjišťována relativní produkce interleukinů, chemokinů, adhezivních molekul a inhibitorů. Testované molekuly byly BCA-1, C5a, G-SCF, GM-CSF, I-309, Eotaxin, sICAM-1, INF γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1 ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-23, IL-27, IP-10, I-TAC, KC, M-CSF, JE (MCP-1), MCP-5, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, SDF-1, TARC, TIMP-1, TNF α a TREM-1.

U molekul BCA-1, C5a, Exotaxin, INF γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-12 p70, IL-17, IL-27, I-TAC, MCP-5 a MIG nebyla zaznamenána žádná produkce.

Graf 1 ukazuje vliv klíštěcích slin a rekombinantního klíštěcího proteinu IRS-2 na produkci molekul G-SCF, GM-CSF, I-309, sICAM, IL-1 α a IL-1 β po stimulaci boreliemi.

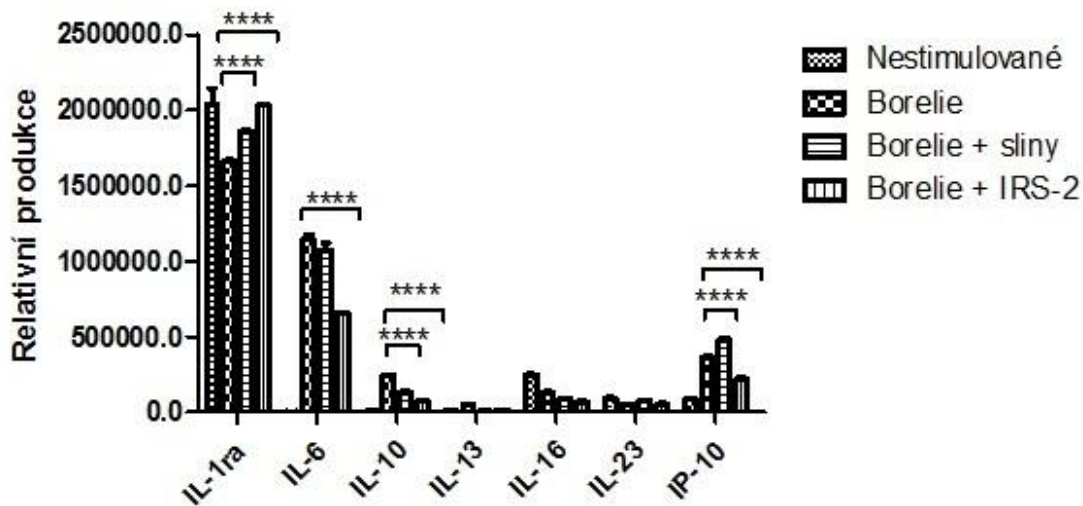
Klíštěcí sliny signifikantně snižovaly množství molekul G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , I-309 a sICAM-1. Rekombinantní protein signifikantně snižoval relativní množství molekul G-CSF, I-309, sICAM-1, IL-1 α a IL-1 β .



Graf 1: Vliv klíčících slin a IRS-2 na produkci G-CSF, GM-CSF, I-309, sICAM-1, IL-1 α a IL-1 β dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

V grafu 2 je možné vidět vliv klíčících slin a rekombinantního klíčícího proteinu IRS-2 na relativní produkci molekul IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16 a IL-23 a IP-10 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

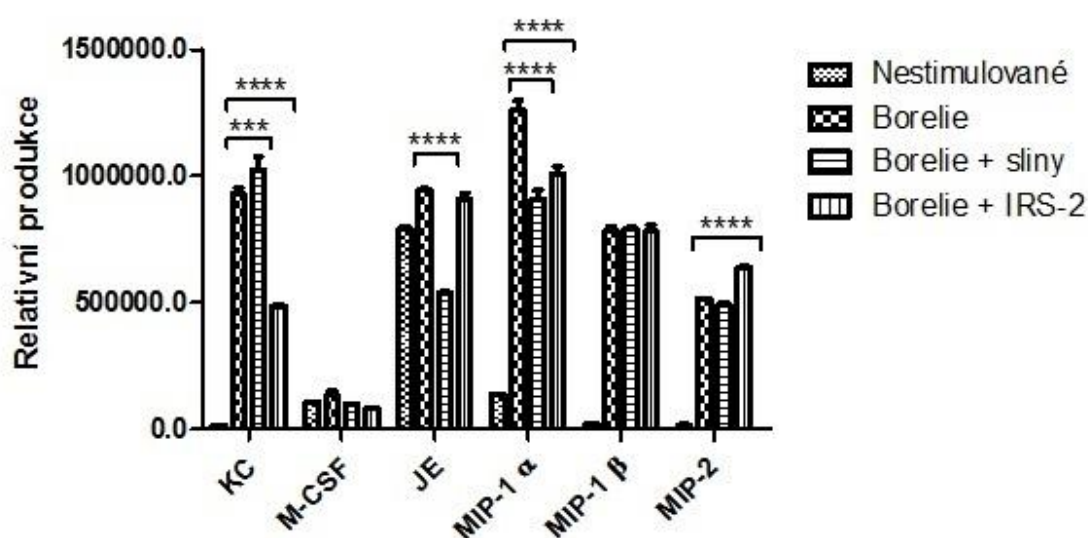
Po inkubaci s klíčícími slinami došlo k signifikantnímu snížení množství molekul IL-10 a naopak signifikantnímu zvýšení množství molekul IL-1ra a IP-10. Vlivem rekombinantního proteinu IRS-2 bylo zaznamenáno signifikantní snížení množství molekul IL-6, IL-10 a IP-10. Množství molekul IL-1ra IRS-2 signifikantně zvyšoval.



Graf 2: Vliv klíštěcích slin a IRS-2 na produkci IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IL-23 a IP-10 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

V grafu 3 je znázorněn vliv klíštěcích slin a rekombinantního klíštěcího proteinu IRS-2 na produkci molekul M-CSF, KC, JE (MCP-1), MIP-1 α , MIP-1 β a MIP-2 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

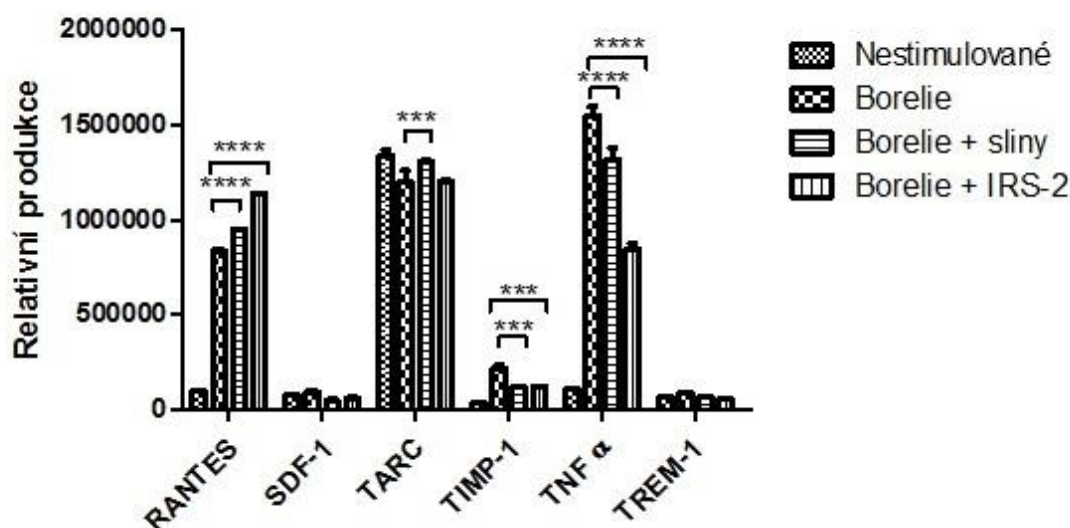
Ukázalo se, že klíštěcí sliny významně snižovaly množství molekul JE (MCP-1) a MIP-1 α a naopak významně zvyšovaly množství molekul KC. Rekombinantní protein IRS-2 významně ovlivnil produkci molekul MIP-1 α , KC a MIP-2, množství molekul MIP-1 α bylo sníženo, množství molekul KC a MIP-2 se naopak zvyšovalo.



Graf 3: Vliv klíštěcích slin a IRS-2 na produkci KC, M-CSF, JE (MCP-1), MIP-1 α , MIP-1 β a MIP 2 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

Graf 4 ukazuje vliv klíštěcích slin a rekombinantního klíštěcího proteinu IRS-2 na produkci molekul RANTES, SDF-1, TARC, TIMP-1, TNF α a TREM-1 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi

Vlivem klíštěcích slin došlo k významnému snížení množství molekul TIMP-1 a TNF α a naopak se významně zvýšilo množství molekul RANTES a TARC. Rekombinantní protein IRS-2 významně snižoval množství molekul TIMP-1 a TNF α a naopak významně zvyšoval množství molekul RANTES.



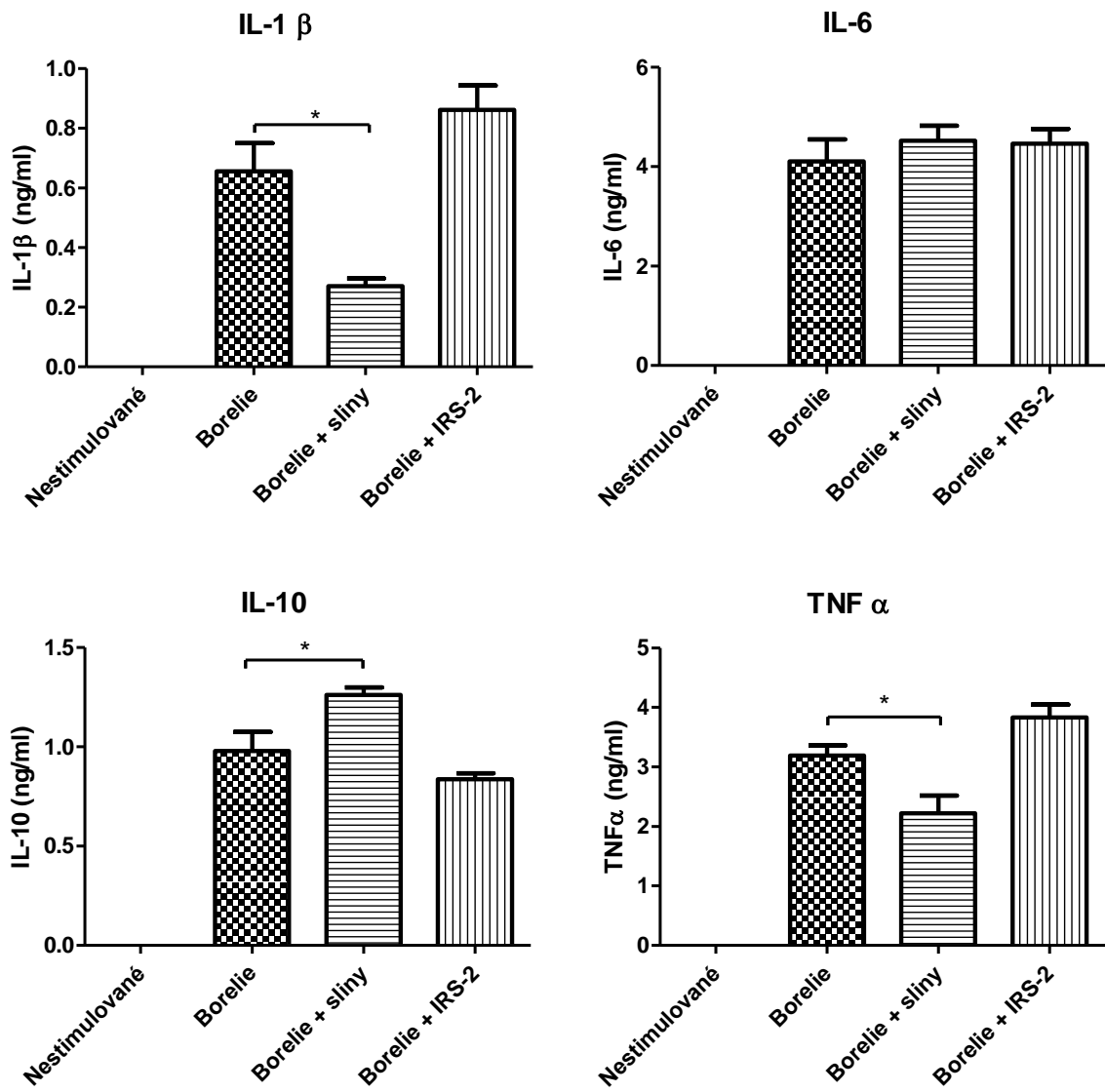
Graf 4: Vliv klíčtějších slin a IRS-2 na relativní produkci RANTES, SDF-1, TARC, TIMP-1, TNF α a TREM-1 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

4.1.2 Stanovení produkce cytokinů metodou ELISA

Výsledky získané v arrayi jsme se pokusili potvrdit v dalších experimentech metodou ELISA. Byl testován vliv klíčtějších slin a rekombinantního klíčtějšího proteinu IRS-2 na produkci cytokinů IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-10 a TNF α dendritickými buňkami, které byly aktivovány boreliemi. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.1.5.

Graf 5 ukazuje vliv klíčtějších slin a rekombinantního klíčtějšího proteinu IRS-2 na produkci IL-1 β , IL-6, IL-10 a TNF α dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

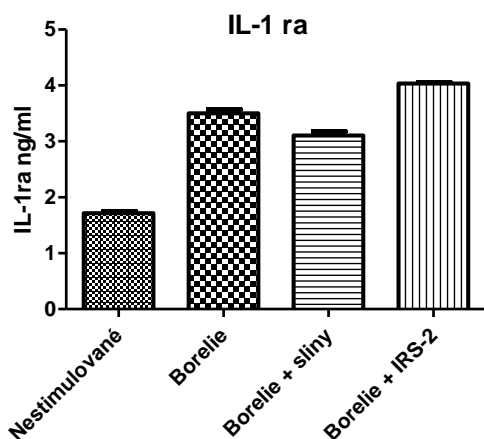
Klíštější sliny signifikantně snižovaly produkci IL-1 β (o více než 50%) a TNF α (přibližně o 20%), a naopak zvyšovaly produkci IL-10 (přibližně o 30 %). Rekombinantní protein IRS-2 nevyvolal v produkci cytokinů žádné signifikantní změny.



Graf 5: Vliv klíštěcích slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci cytokinů IL-1 β, IL-6, IL-10 a TNF α..

Graf 6 znázorňuje vliv klíštěcích slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci IL-1 ra.

Klíštěcí sliny ani rekombinantní protein IRS-2 neměly na produkci této molekuly žádný vliv.



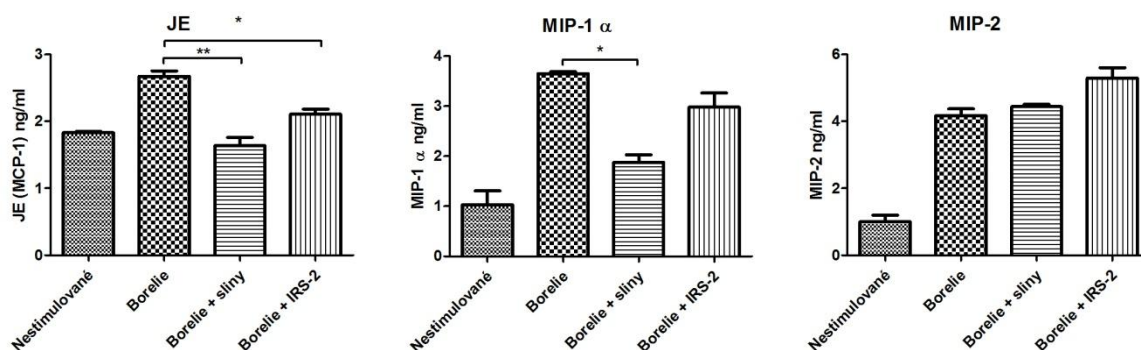
Graf 6: Vliv klíčkových slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci IL-1 ra.

4.1.3 Stanovení produkce chemokinů metodou ELISA

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vliv klíčkových slin a rekombinantního klíčkového proteinu IRS-2 na produkci chemokinů MIP-1 α , MIP-2 a JE (MCP-1) dendritickými buňkami, které byly aktivovány boreliemi, a tak potvrdit či vyvrátit výsledky získané z arraye popsané v kapitole 4.1.1. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.1.6.

Graf 7 zobrazuje vliv klíčkových slin a rekombinantního klíčkového proteinu IRS-2 na produkci chemokinů JE (MCP-1), MIP-1 α a MIP-2 dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

Klíčkové sliny významně snižovaly produkci JE (téměř o 40%) a MIP-1 α (o 50%). Rekombinantní protein IRS-2 významně snižoval produkci JE (o 20%).



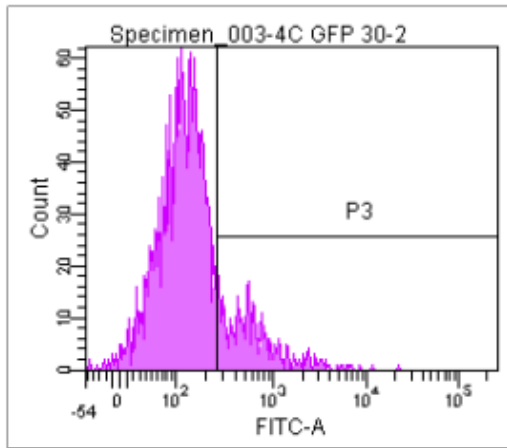
Graf 7: Vliv klíčkových slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na produkci chemokinů JE (MCP-1), MIP-1 α a MIP-2.

4.2 Vliv klíštěcích slin na fagocytózu borelií DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

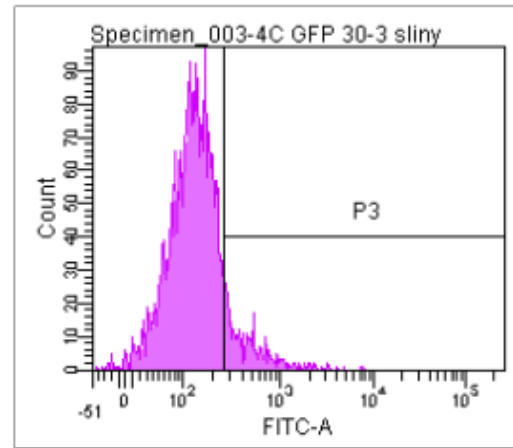
V tomto pokuse byl zkoumán vliv klíštěcích slin na fagocytózu borelií. Postup pokusu se popsán v kapitole 3.2.2. V experimentu byly použity dva typy borelií - *Borrelia burgdorferi* 297-GFP a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ATCC) barvené barvivem eFluor 670.

V pokuse byla nejdříve změřena adheze borelií k buňkám při 4°C, jejichž hodnoty byly poté odečteny od hodnot naměřených u buněk, které fagocytovaly při 37°C.

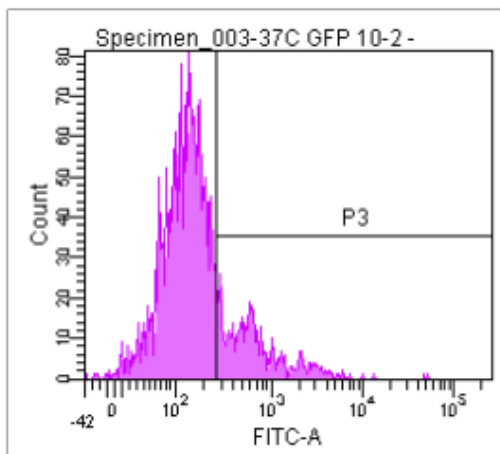
Pro ukázkou přikládám histogramy znázorňující adhezi a fagocytózu borelií v absenci a v přítomnosti klíštěcích slin, ze kterých pak byla vypočítaná adheze a fagocytóza borelií (Obr. 11, Obr. 12., Obr. 13, Obr. 14).



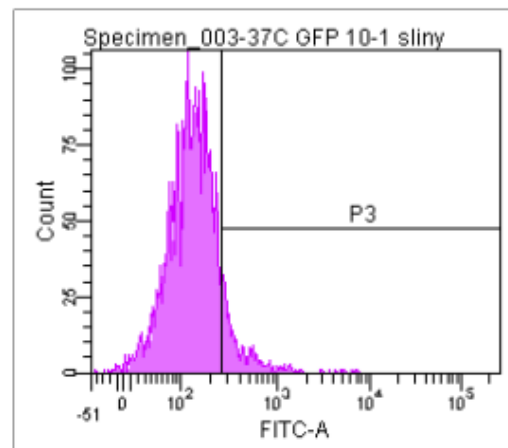
Obr. 11: Dendritické buňky inkubované 30 min s GFP boreliemi při 4°C. P3 – populace s adherovanými boreliemi.



Obr. 12: Se slinami preinkubované dendritické buňky inkubované 30 min s GFP boreliemi při 4°C. P3 – populace s adherovanými boreliemi.

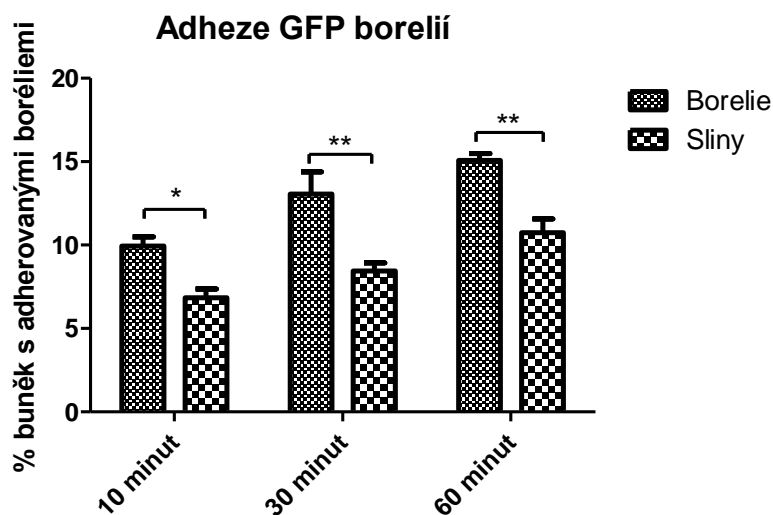


Obr. 13: Dendritické buňky inkubované 10 min s GFP boreliemi při 37°C. P3 – populace fagocytujících buněk.



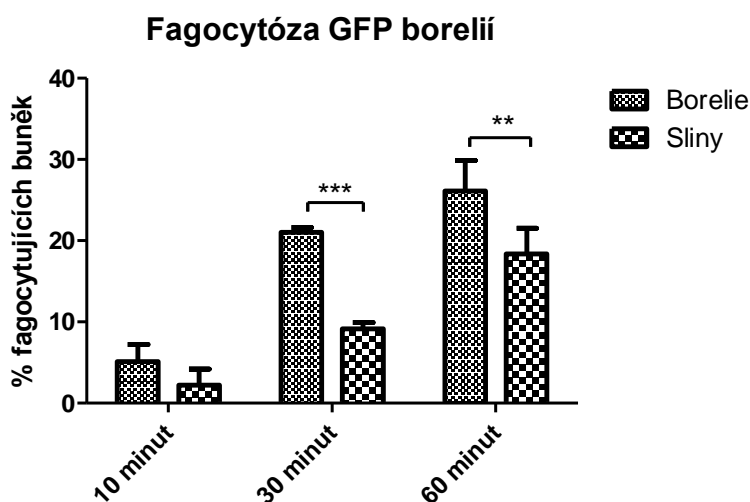
Obr. 14: Se slinami preinkubované dendritické buňky inkubované 10 min s GFP boreliemi při 37°C. P3 – populace fagocytujících buněk.

Vliv klíštěcích slin na adhezi GFP borelií zobrazuje Graf 8. Inkubace dendritických buněk s klíštěcími slinami vedla k signifikantnímu snížení adheze v časovém intervalu 10 min, a to z 10% na 7%; v intervalu 30 min došlo k signifikantnímu snížení z 13% na 8%; v intervalu 60 min pak došlo je snížení z 15% na 10,5%.



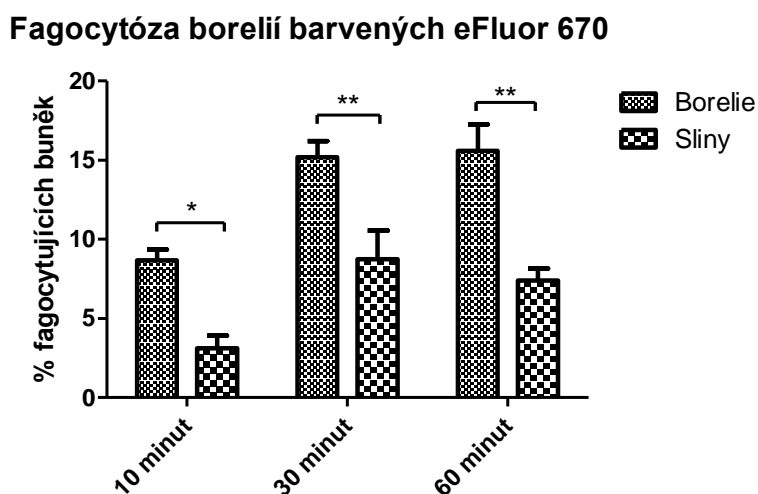
Graf 8: Vliv klíštěcích slin na % dendritických buněk s adherovanými GFP boreliemi.

Vliv klíštěcích slin na fagocytózu GFP borelií dendritickými buňkami zobrazuje Graf 9. Inkubace dendritických buněk s klíštěcími slinami vedla k signifikantnímu snížení fagocytózy v časovém intervalu 30 min a to z 20% na 9%; v intervalu 60 min pak došlo je snížení z 26% na 18%.



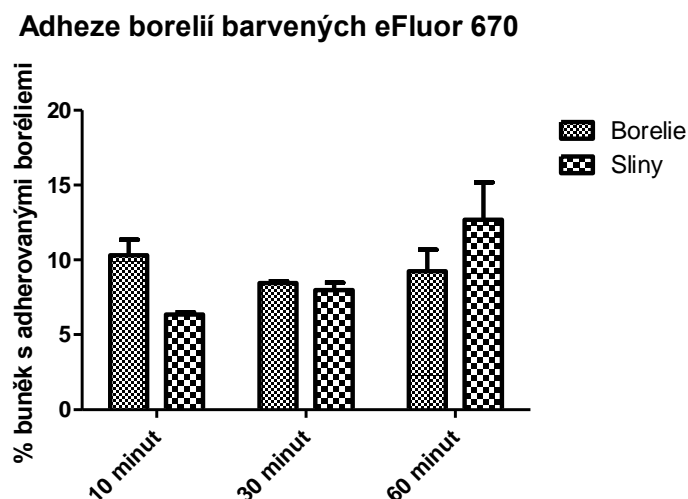
Graf 9: Vliv klíštěcích slin na % dendritických buněk fagocytujících GFP borelie.

Vliv klíštěcích slin na fagocytózu borelií obravených eFluor 670 dendritickými buňkami zobrazuje Graf 10. Inkubace dendritických buněk s klíštěcími slinami vedla k signifikantnímu snížení fagocytózy v časovém intervalu 10 min, a to z 9% na 3%; v intervalu 30 min došlo k signifikantnímu snížení z 15% na 8%; v intervalu 60 min pak došlo je snížení z 15,5% na 7,5%.



Graf 10: Vliv klíštěcích slin na % dendritických buněk fagocytujících borelie obarvené eFluor 670.

Vliv klíštěcích slin na adhezi borelií barvených eFluor 670 zobrazuje Graf 11. Inkubace dendritických buněk s klíštěcími slinami nevedla k žádným signifikantním změnám adherence.



Graf 11: Vliv klíštěcích slin na % dendritických buněk s adherovanými boreliemi obarvenými eFluor 670.

4.3 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA EXPRESI GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZY

4.3.1 Fagocytární array

V tomto pokuse byl zkoumán vliv klíštěcích slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na expresi genů účastnících se fagocytózy. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.2.2.1.

Byla testována exprese bylo různých genů účastnících se fagocytózy spadajících do několika kategorií. Byla zkoumána exprese genů pro receptory účastnící se fagocytózy – Ager, Cd14, Cd36, Clec7a (Dectin1), Colec12, Crp, Fas (Tnfrsf6), Fcer1g, Fcgr1, Fcgr2b, Fcgr3, Ill1rl1 (St2), Itgam, Itgav, Itgb2, Marco, Mfge8, Myd88, Pecam1, Ticam1 (TRIF), Tlr3 a Tlr9; genů důležitých pro rozpoznání a pohlcení mikroorganismů při fagocytóze – Anxa1, C3, Cd44, Cd47, Ceacam3, Crk, Csf1 (Mcsf), Csf2 (GMCSF), Elmo1, Gulp1, Ifng, Mbl2, Mcoln3, Mif, Scarb1, Singlec1, Sirpb1a, Tnf a Wnt5a; genů důležitých pro maturaci fagosomu – Cnn2, Iqsec1, Pld1, Rab5a, Rab7, Stx18, Vamp7 a Was; genů pro fagozomální zpracování – Calr, Cyp2s1, Nod1 (Card4), Pla2g4a, Pla2g5,

Pld2, Serpine1 (PAI-1), Sftpd, Stab2, Tgm2 a Tnfsf11 (RANKL); a genů pro signální transdukci – Adipoq (Acrp30), Axl, Clic4, Csk, DOck1, Dock2, Fyn, Lyn, Mapk14 (p38alpha), Mertk, Msn, Pik3cb, Pip5k1b, Prkce, Pros1, Pten, Rac1, Rac2, Rala, Ralb, Rapgef3, Rhoa, Syk (Sykb) a Vav1.

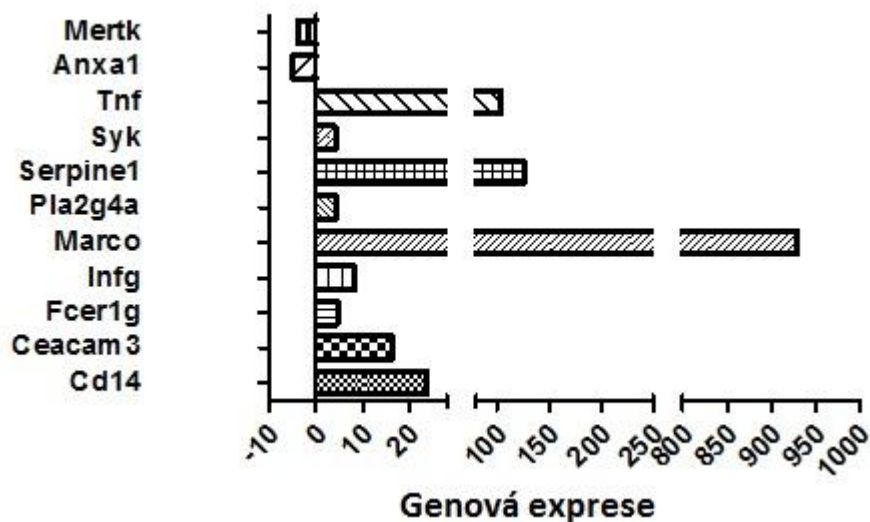
Geny a jejich produkty, u kterých došlo ke změně exprese, jsou vypsané v tabulce 2.

Tabulka 2: Geny, u kterých došlo ke změně exprese a jejich produkty.

Gen	Skupina	Produkt
Anxa1	Rozpoznání a pohlcení	Annexin A1
Axl	Signální transdukce	AXL receptor pro tyrosinovou kinázu
Cd14	Fagocytární receptory	Receptor vázající některé povrchové molekuly mikrobů a hub
Ceacam3	Rozpoznání a pohlcení	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3
Fcer1g	Fagocytární receptory	Fc fragment IgE receptoru
Fcgr1	Fagocytární receptory	Fc fragment IgG receptoru
Il1rl1	Fagocytární receptory	Interleukin 1 receptor like 1
Infg	Rozpoznání a pohlcení	Interferon γ
Marco	Fagocytární receptory	Makrofágový receptor s kolagenovou strukturou
Mertk	Signální transdukce	c-mer protoonkogenová tyrosinová kináza
Pecam1	Fagocytární receptory	Platelet/endothelial buněčná adhesivní molekula
Pla2g4a	Fagozomální zpracování	Fosfolipáza A2, skupina IVA
Pla2g5	Fagozomální zpracování	Fosfolipáza A2, skupina V
Pld2	Fagozomální zpracování	Fosfolipáza D2
Rapgef3	Signální transdukce	Rap guaninový nukleotidový exchange faktor 3
Serpine1	Fagozomální zpracování	Inhibitor serinové peptidázy 1
Siglec1	Rozpoznání a pohlcení	Sialoadhesin
Syk	Signální transdukce	Slezinná tyrosinová kináza
Ticam1	Fagocytární receptory	Toll-like receptor adaptorová molekula 1
Tnfsf11	Fagozomální zpracování	Tumor nerotizující faktor 11
Wnt5a	Rozpoznání a pohlcení	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A

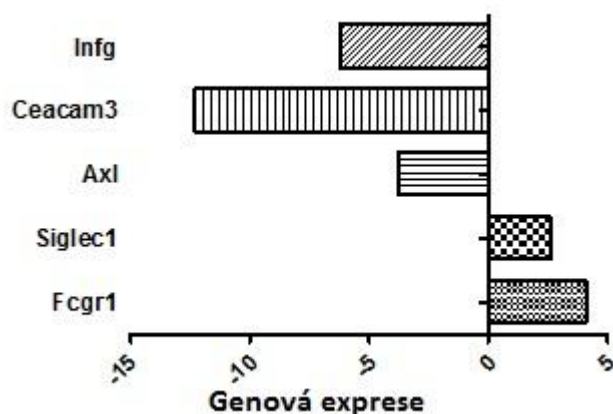
Vliv stimulace boreliemi na expresi genů účastnících se fagocytózy je znázorněn v Grafu 12.

Stimulace boreliemi snížila expresi genů Mertk (4×) a Anxa1 (5×) a naopak zvýšila expresi genů Tnf (100x), Syk (4×), Serpine1 (126×), Pla2g4a (4×), Marco (téměř 1000×), Infg (8×), Fcer1g (4,5×), Ceacam3 (16×) a Cd14 (23,5×).



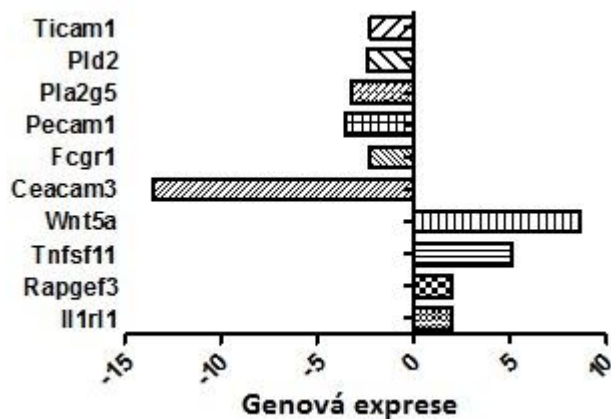
Graf 12: Geny se změnou exprese po stimulaci borelie (v porovnání s geny nestimulovaných buněk, vyjádřeno násobným snížením/zvýšením exprese).

Co se týče vlivu slin, inkubace buněk s klišťecími slinami před stimulací boreliemi způsobila snížení exprese genů *Infg* (6×), *Ceacam3* (12×) a *Axl* (4×) a naopak zvýšila expresi genů *Siglec1* (2,5×) a *Fcgr1* (4×) (Graf 13).



Graf 13: Geny se změnou exprese po inkubaci se slinami (v porovnání s geny buněk stimulovaných s boreliemi, vyjádřeno násobným snížením/zvýšením exprese).

Inkubace buněk s rekombinantním proteinem IRS-2 před stimulací boreliemi ovlivnila také expresi několika genů, způsobila snížení exprese genů *Ticam1* (2×), *Pld2* (2×), *Pla2g5* (3×), *Pecam1* (3,5×), *Fcgr1* (2×) a *Ceacam3* (13,5×) a naopak zvýšení exprese genů *Wnt5a* (8,5×), *Tnfsf11* (5×), *Rapger3* (2×), *Ilr11* (2×) (Graf 14).



Graf 14: Gen se změnou exprese po inkubaci s rekombinantním proteinem IRS-2 (v porovnání s geny buněk stimulovaných s boreliemi, vyjádřeno násobným snížením/zvýšením exprese).

4.3.2 Real-time PCR

Naším posledním cílem bylo potvrdit výsledky získané z fagocytární arraye. Jako první byl vybrán Ceacam3, který se účastní rozpoznání a pohlcení při fagocytóze, a exprese kterého byla v arrayi indukována 16x a slinami i IRS-2 inhibována téměř na úroveň nestimulovaných buněk. Metodou real-time PCR byl zkoumán i vliv klíštěcích slin a rekombinantního proteinu IRS-2 na expresi genu Ceacam3. Postup je popsán v kapitole 3.2.3.5.

Bohužel exprese genu Ceacam3 byla u všech vzorků pod detekovatelnou hranicí.

5 DISKUZE

Klíště je vektorem k přenosu lymeské boreliózy, která je momentálně jedním nejrozšířenějších onemocnění přenášených členovci v Evropě a USA. Během koevoluce se svými hostiteli si klíště, i samotné borelie, které jsou patogenem způsobujícím lymeskou boreliózu, našli mnoho způsobů, jak obcházet imunitní systém hostitele.

Klíštěcí sliny obsahují mnoho látek, které různými způsoby ovlivňují hostitelskou imunitní reakci. Pro další zkoumání přenosu borelií klíštěcími slinami je nutné zjistit, jak tyto látky imunitní systém ovlivňují. Navíc by se dalo využít jednotlivých látek ze slin k léčbě různých krevních a imunitních poruch.

Hlavním úkolem mé diplomové práce bylo zjistit vliv klíštěcích slin z *I. ricinus* a rekombinantního proteinu IRS-2 na dendritické buňky, které hrají důležitou roli v započetí imunitní reakce. Zkoumání vlivu bylo provedeno na několika úrovních – zkoumání vlivu na molekuly produkované DCs, fagocytózy borelií DCs a změny exprese genů.

5.1 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN A REKOMBINANTNÍHO PROTEINU IRS-2 NA PRODUKCI CYTOKINŮ A CHEMOKINŮ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI PO STIMULACI BORELIEMI

V první části své diplomové práce jsem se zaměřila na vliv slin klíštěte *I. ricinus* a rekombinantního proteinu ze slin *I. ricinus*, serpinu IRS-2, na produkci cytokinů dendritickými buňkami po stimulaci boreliemi.

Produkce cytokinů, chemokinů a ostatních molekul v našich experimentech po stimulaci boreliemi ve většině případů rostla. Sledovali jsme nárůst produkce G-SCF, I-309, sICAM-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IP-10, KC, M-CSF, JE, MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TIMP-1 a TNF α .

V dřívějších studiích již bylo dokázáno, že povrchové proteiny *B. burgdorferi* aktivují endoteliální buňky, neutrofilů, makrofágy a B lymfocyty in vitro, a indukují lokalizovaný zánět v koleních kloubech a kůži in vivo (Wooten et al, 1996; Ma et al, 1994; Norgard et al, 1996; Morrison et al, 1997; Ma et al, 1993; Norgard et al, 1995; Gondolf et al, 1994). Buňky jsou stimulovány k produkci cytokinů podobně jako za použití LPS, ačkoliv borelie LPS neprodukuje (Takayama et al, 1987). Signalizace

zánětlivé reakce na povrchové proteiny *B. burgdorferi*, jež vede ke zvýšení produkce cytokinů, je zprostředkována především přes TLR2 (Hirschfeld, 1999). Zvýšená produkce cytokinů a chemokinů po stimulaci boreliemi je tedy obvyklá.

Při sledování vlivu preinkubace buněk s klíštěcími slinami na produkci cytokinů po stimulaci boreliemi docházelo ke snížení produkce mnoha z molekul. Signifikantní úbytek produkce jsme pozorovali u G-CSF, I-309, sICAM-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IP-10, JE, MIP-1 α , TIMP-1 a TNF α . Při dalším testování několika z těchto molekul metodou ELISA se nám potvrdily výsledky v případě IL-1 β , TNF α , JE a MIP-1 α . Navíc jsme získali protichůdné výsledky z ELISA testu ohledně IL-10 – jeho produkce se použitím slin zvyšovala. Výsledek z ELISA testu by lépe korespondoval s dřívějšími testy. In vivo bylo prokázáno, že klíštěcí sliny navozují Th2 imunitu charakterizovanou produkcí vysokého množství IL-4 a IL-10, zatímco produkce cytokinů INF γ a IL-12 je snížena (Ferreira Silva, 1999; Schoeler et al, 1999; Christe et al, 1999; Meijri et al, 2001). Nicméně my jsme v našich experimentech vůbec nezaznamenali produkci IL-4, IL-12 a INF γ . Je možné, že jsou tyto cytokiny in vivo produkovány jinými buňkami, nebo za podnětů, kterých se jim v buněčné kultuře nedostává. Podle pokusů prováděných v naší laboratoři na myších splenocytech jsme očekávali, že JE (MCP-1) bude po vystavení slinám upregulovaný (Langhansová et al, 2015). Navíc signifikantní snížení produkce IL-10 klíštěcími slinami, pozorované v arrayi, by korelovalo s experimenty, které byly dříve provedeny v naší laboratoři na dendritických buňkách (Slámová et al, 2011; Páleníková, 2012). Jiný experiment na BMDCs zase pojednává o snížení produkce IL-12 buňkami při preinkubaci se slinami *Rhipicephalus sanguineus*, zatímco produkce IL-10 zůstává nezměněna (Cavassani, 2005). Je tedy možné, že sliny různých klíšťat působí odlišným způsobem na různé buňky.

Bylo dokázáno, že preinkubací dendritických buněk se slinami klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* dochází k inhibici maturace navozené LPS (Cavassani et al, 2005). Pokud mají sliny *I. ricinus* podobné účinky, vysvětlovala by snížená maturace i menší produkci cytokinů a chemokinů.

Vliv rekombinantního proteinu IRS-2 se zdá velmi podobný slinám. Stejně jako sliny snižoval produkci G-CSF, I-309, sICAM-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IP-10, MIP-1 α , TIMP-1 a TNF α . Navíc inhiboval i produkci IL-6 a KC. U měření produkce MIP-2 bylo při preinkubaci s IRS-2 zaznamenán nárůst. Snížená produkce cytokinu IL-6 by souhlasila

s výsledky experimentu, který probíhal v naší laboratoři za použití DCs ze sleziny. Bylo dokázáno, že IRS-2 potlačuje expresi genu pro IL-6 (Páleníková et al, 2015). Produkce MIP-2 byla zvýšena jako u již zmíněného experimentu s myšími splenocyty (Langhansová et al, 2015). Je tedy možné, že složkou slin, která by měla produkci tohoto chemokinu ovlivňovat, je právě IRS-2 a v našich slinách pouze nebylo v dostatečné koncentraci. Snížení produkce ostatních cytokinů může být opět vysvětlena inhibicí maturace buněk.

Důvodem, proč array a ELISA experimenty vycházely odlišně, může být jiné mikroprostředí při stimulaci buněk. Ačkoliv byly buňky zakládány ve stejné koncentraci, na array byly stimulovány v 6-jamkovém panelu, zatímco na ELISA v 96-jamkovém. Dalším důvodem může být odlišná citlivost metod.

5.2 VLV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA FAGOCYTÓZU BORELIÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI

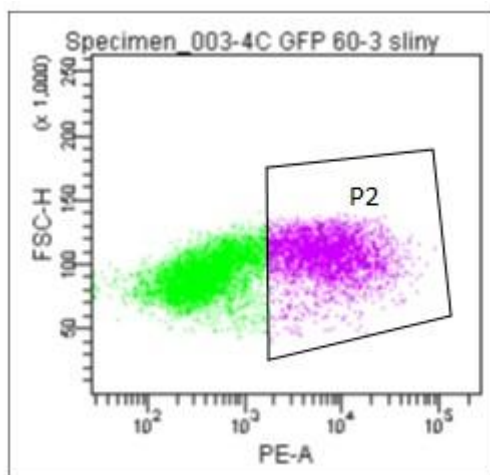
5.2.1 OPTIMALIZACE METODY – DERIVACE A MĚŘENÍ

Součástí mé práce byla optimalizace derivace a následného zacházení s dendritickými buňkami při měření fagocytózy pomocí průtokové cytometrie. Vzhledem k tomu, že dendritické buňky derivované z kostní dřeně jsou velice citlivé a i nepatrné narušení jejich buněčné suspenze vede k jejich aktivaci a maturaci (Pierre et al, 1997), dlouho se nám nedařilo získat buňky schopné fagocytózy. K derivaci byl původně v naší laboratoři používán protokol pro derivaci BMDC podle Lutze (Lutz et al ,1999) s minimálními úpravami, kdy se buňky derivovaly osm dní. Takto vyderivované buňky sice obsahovaly velké množství buněk CD11c pozitivních, avšak přišli jsme na to, že buňky jsou příliš maturované a nejsou tudíž schopny fagocytózy.

Dozvěděli jsme se, že pro derivaci nematurovaných BMDC je vhodná spíše šestidenní derivace (Madaan et al, 2014). Proto byla doba derivace zkrácena na šest dní a koncentrace GM-CSF v médiu zvýšena (koncentrace byla zvýšena z 20 ng/ml na 30 ng/ml). Buňky byly získány jemným oplachem misky médiem, stočeny, resuspendovány v kompletním RPMI s 5 ng/ml GM-CSF a ihned použity v experimentu.

Vzhledem ke zkrácené derivaci bylo v buněčné suspenzi asi jen 50% CD11c pozitivních buněk, jejichž fagocytózu jsme chtěli zkoumat. K získání čisté populace CD11c pozitivních buněk bychom mohli použít magnetickou separaci s kuličkami

s protilátkou proti CD11c, ovšem tímto způsobem by pravděpodobně opět došlo k nechtěné maturaci buněk (Zarnani et al, 2006). Proto jsme místo toho buňky po samotné fagocytóze obarvili protilátkou proti CD11c fluorescenčním barvivem a pozorovali tak fagocytózu pouze CD11c pozitivních buněk (Obr. 15).



Obr. 15: Populace buněk pozitivních na CD11c – dendritické buňky (P2).

Abychom s buňkami zacházeli co nejšetrněji a nejrychleji, nasadili jsme je, místo na 96-jamkový kultivační panel, rovnou do U-panelu, v němž byly buňky i promývány a barveny, takže jsme se vyhnuli jejich zbytečnému přesouvání.

Při samotné měření samotné fagocytózy bylo nutné odlišit borelie, které byly buňkami opravdu fagocytovány, a borelie, které byly na buňkách pouze adherované. K tomu jsme využili toho, že při 4°C je fagocytóza inhibována a umožněna je jen adherence (Gaforio et al, 2002). Experiment jsme tedy prováděli na dvou skupinách buněk, z nichž první byly po celou dobu drženy při 4°C, a u druhých byla umožněna fagocytóza při 37°C. Před samotným přidáním borelií byly obě skupiny vychlazeny na 4°C (15 min), po jejich přidání se ještě dalších 30 min v 4°C držely, aby se dosáhlo srovnání metabolismu buněk a aby začaly fagocytovat všechny ve stejnou dobu. V pokuse byla nejdříve změřena adheze borelií k buňkám při 4°C, jejichž hodnoty byly poté odečteny od hodnot naměřených u buněk, které fagocytovaly při 37°C.

5.2.2 OVLIVNĚNÍ FAGOCYTÓZY DCs

Během série několika pokusů jsme zkoumali, jaký vliv mají sliny klíštěte *I. ricinus* na fagocytózu borelií dendritickými buňkami derivovanými z kostní dřeně myši.

Bylo dokázáno, že klíštěcí sliny mají inhibiční efekt na fagocytózu neutrofilů (sliny *I. dammini*) a zabíjení patogenů makrofágy (sliny *I. ricinus*) (Ribeiro, 1990; Kuthejlová et al, 2001). Pomocí metody nepřímé imunofluorescence bylo potvrzeno, že sliny zhoršují schopnost makrofágů fagocytovat borelie (Kýčková & Kopecký, 2006).

V naší laboratoři jsme již pozorovali snížení fagocytózy pHrodo kuliček a borelií makrofágy (linie PMJ2-R) vlivem klíštěcích slin metodou průtokové cytometrie (Páleníková, 2012).

Slámová et. al (2011) dokázali na dendritických buňkách izolovaných ze sleziny myši C3H/HeN metodou nepřímé imunofluorescence, že sliny klíštěte *I. ricinus* snižují fagocytózu borelií těmito buňkami. Tato metoda je však velice nepřesná. Proto se Jana Páleníková pokusila o měření fagocytózy sleziných dendritických buněk metodou průtokové cytometrie. Tyto buňky však byly příliš maturované a svoji schopnost fagocytovat již ztratily (Páleníková, 2012). Navíc nikdy nebyl zkoušen vliv klíštěcích slin na fagocytózu borelií dendritickými buňkami derivovanými z kostní dřeně.

V našich experimentech se prokázalo, že vlivem klíštěcích slin dochází nejen ke snížení fagocytózy borelií dendritickými buňkami derivovanými z kostní dřeně, ale nejspíše také ke snížení adherence borelií k jejich povrchu. Toto zjištění koresponduje s pokusy s jinými buňkami - s lidskými neutrofily, ve kterých se zjistilo, že neutrofily preinkubované s klíštěcími slinami mají nižší schopnost vázat spirochety *B. burgdorferi* (Montgomery et al, 2004).

Snížení schopnosti fagocytózy při preinkubaci se slinami může mít mnoho důvodů – nedostatek adhezivních molekul, blokaci receptorů, inhibici signálů nezbytných pro fagocytózu a podobně. Mechanismus inhibice fagocytózy musí být ještě prozkoumán.

5.3 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN A REKOMBINANTNÍHO PROTEINU IRS-2 NA EXPRESI GENŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FAGOCYTÓZY

V našem předchozím experimentu jsme dokázali, že klíštěcí sliny snižují schopnost BMDCs fagocytovat borelie. V našem posledním experimentu jsme se zaměřili na změnu exprese genů, které se fagocytózy účastní.

Nejdříve jsme se věnovali tomu, jak genovou expresi ovlivní stimulace boreliemi. Přišli jsme na to, že borelie zvyšují expresi genů *Tnf*, *Syk*, *Serpine1*, *Pla2g4a*, *Marco*, *Infg*, *Fcer1g*, *Ceacam3* a *Cd14*.

Největší upregulace byla prokázána u genu *Marco*, který kóduje makrofágový receptor s kolagenovou strukturou. Jedná se o scavengerový receptor, který se účastní fagocytózy (Kraal et al, 2000). MARCO může být exprimován i na buňkách, které jej obvykle na svém povrchu nemají, například právě při bakteriální infekci (Kraal et al, 2000; Kangas et al, 1999). Byla zkoumána i role tohoto receptoru v rámci fagocytózy *B. burgdorferi* a experimenty dokázaly, že MARCO-deficientní myši mají signifikantně sníženou schopnost pohlcení těchto spirochet (Petnicki-Ocwieja et al, 2013). Zvýšení exprese tohoto genu po stimulaci boreliemi tedy není překvapení, stejně tak jako zvýšení ostatních genů, které pomáhají realizovat pohlcení *B. burgdorferi*.

Když se buňky před stimulací boreliemi preinkubovaly s klíštěcími slinami, došlo k významnému snížení exprese genů *Infg*, *Ceacam3* a *Axl*.

Dříve bylo *in vitro* dokázáno na myších splenocytech, že klíštěcí sliny snižují produkci $\text{INF}\gamma$, který *Infg* kóduje, pravděpodobně zvýšením produkce IL-10 (Kopecký et al, 1999). My ovšem v předchozích experimentech tak výrazné zvýšení IL-10 nezaznamenali. Kopecký et al. ve svém experimentu dokazují svoje tvrzení tím, že když je do buněčné suspenze přidána IL-10 neutralizující protilátka, nebo když je do suspenze dodáno IL-1 β , produkce $\text{INF}\gamma$ se normalizuje. V našem případě tedy může mít na genovou expresi vliv snížení produkce samotného IL-1 β .

CEACAM3 patří do rodiny CEACAM – carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (Beauchemin et al, 1999; Kuspert et al, 2006). Některé z CEACAMů se nacházejí na epiteliálních buňkách a jsou využívány nitrobuněčnými parazity, jako jsou *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis*, k průniku do buňky (Bradley et al, 2005; Muenzner et al, 2005). Bylo ovšem dokázáno, že *N. gonorrhoeae* může být fagocytována opsonin-independentní CEACAM3-dependetní cestou lidskými granulocyty (Chen & Gotschlich, 1996; Gray-Owen et al, 1997; Hauck et al, 1998; Virji et al, 1996), kdy je za tento proces CEACAM3 přímo odpovědný (Schmitter et al, 2004; Schmitter et al, 2007). CEACAM3 takto funguje i při infekcích jinými bakteriemi. Snížením exprese genu pro tuto adhezivní molekulu tedy může docházet ke snížení fagocytární schopnosti.

AXL, produkt genu *Axl*, je receptorem pro tyrosinovou kinázu, který silně limituje produkci interferonů typu I negativní zpětnou vazbou (Bhattacharyya et al, 2013; Rothlin et al, 2015; Rothlin et al, 2007; Zagorska et al, 2014). AXL je navíc fagocytárním receptorem, který zprostředkovává pohlcení apoptických buněk (Rothlin et al, 2015; Zagorska et al, 2014). Bylo navíc dokázáno, že maturace DCs a IL-1 β je v myších postrádajících gen pro AXL narušena (Schmid et al, 2016). I snížená exprese genu *Axl* může mít za následek snížení fagocytózy.

Zvláštní bylo zvýšení exprese genu *Siglec1* po preinkubaci se slinami. Jeho produkt, Siglec-1 (sialic acid-binding IgG-like lectin), je sialoadhesin exprimovaný na specifických makrofágových subpopulacích a dendritických buňkách. Mohou zprostředkovávat na sialových kyselinách dependentní i independentní interakce s buňkami imunitního systému (Crocker et al, 2007). Tento endocytický receptor váže a pohlcuje sialované bakterie a viry. Na povrchu *B. burgdorferi* se sialové kyseliny nachází (Hulínská et al, 1992), takže efekt zvýšení exprese *Siglec1* po preinkubaci se slinami by fagocytóze borelií spíše nahrával. Přesná úloha a mechanismy působení sialoadhesinu však ještě nejsou v tomto ohledu prozkoumané.

Preinkubací buněk s rekombinantním proteinem IRS-2 bylo dosaženo téměř stejného snížení exprese genu *Ceacam3* jako při použití klíštěcích slin. IRS-2 navíc mírněji snižovalo ještě expresi několika dalších genů – *Ticam1*, který kóduje adaptorovou molekulu, *Pld2*, kódující fosfolipázu D2, *Pla2g5*, jehož produktem je kalcium-dependentní fosfolipáza A2, *Pecam1*, kódující adhezivní molekulu PECAM-1, a *Fcgr1*, jehož produktem je Fc fragment IgG receptoru. Snížením exprese všech těchto genů může mít za následek snížení fagocytární schopnosti.

Geny účastníci se fagocytózy ještě nebyly v souvislosti s klíštěcími slinami a rekombinantním proteinem IRS-2 zkoumány. Zjistili jsme, že exprese několika genů je slinami a IRS-2 snižována, což by mohlo mít za následek právě snížení fagocytární schopnosti. Problematicke je ovšem třeba se ještě věnovat a ujasnit mechanismy, jak ke snížení fagocytózy, tak i snížení samotné exprese genů dochází.

6 ZÁVĚR

- byl potvrzen inhibiční vliv klíštěcích slin z *I. ricinus* na produkci IL-1 , TNF α , JE a MIP-1
- klíštěcí sliny z *I. ricinus* snižují fagocytární schopnosti dendritických buněk derivovaných z kostní dřeně a bylo prokázáno, že negativně ovlivňují i adhezi borelií
- výsledky fagocytární arraye ukázaly, že sliny z *I. ricinus* i rekombinantní protein IRS-2 negativně ovlivňují expresi několika genů účastnících se fagocytózy

7 SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosin difosfát
AEP	asparagine endopeptidase
Ag	antigen
APC	antigen presenting cell, antigen prezentující buňka
AMP	adenosin monofosfát
ATP	adenosin trifosfát
BCA	B-cell attracting chemokine
BMDC	bone-marrow dendritic cell, dendritická buňka derivovaná z kostní dřene
BOFES	bovinní fetální sérum
Bp	párů bází
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly-H
CD	cluster of differentiation
CRASP	complement regulator-acquiring surface protein
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
DC	dendritic cell, dendritická buňka
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	double-strand ribonucleic acid, dvouvláknová ribonukleová kyselina
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosin-derived neurotoxin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
G-SCF	granulocyte colony stimulating factor
HBP	histamine binding protein
IL	interleukin
INF	interferon
IRS-2	<i>Ixodes ricinus</i> serpin 2
LPS	lipopolysacharid
MAC	membrane attack complex, membrány atakující komplex
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
mDC	myeloid dendritic cell, myeloidní dendritická buňka
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibile complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIG	monokine induced by gamma interferon
MIP	macrophage inflammatory protein
NK	natural killer, přirozený zabíječ
Osp	outer surface protein, vnější povrchový protein
PAF	platelet-activating factor
PAMP	pathogen associated molecular pattern, s patogeny asociovaný molekulární vzor
PBS	phosphate-buffered saline, fosfáty pufrovaný fyziologický roztok
pDC	plasmacytoid dendritic cell, plasmacytoidní dendritická buňka
PGE-2	prostaglandin E2

PRR	pattern recognition receptor, vzory rozpoznávající receptor
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted chemokine
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell park memorial institute
SAT	saliva-assisted transmission
SDF	stromal cell-derived factor
SEM	standard error of the mean, střední chyba průměrů
sICAM	soluble intercellular adhesion molecule
STAT	signal transducer and activator of transcription
TARC	thymus- and activation-regulated chemokine
TBE	tick-borne encephalitis
TCR	T-cell receptor, T-buněčný receptor
Th	T helper cell, pomocný T lymfocyt
tHRF	tick histamine release factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
TREM	triggering receptor expressed on myeloid cells
TROSPA	tick receptor for OspA, klíčecí receptor pro OspA
VlsE	variable lipoprotein surface-exposed
vmp	variable membrane protein
VSG	variable surface glycoprotein

8 POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA

Aberer, E. (2007): Lyme borreliosis – an update. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 5(5): 406-14.

Aderem, A., Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages.

Annu. Rev. Immunol. 17:593–623.

Alban, S. P., Johnson, P. W., Nelson, D. R. (2000): Serum-starvation induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology.* 146: 119–27.

Albert, M. L., Kim, J. I., Birge, R. B. (2000): Alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Cell. Biol.* 2:899–905.

Alitalo, A., Meri, T., Rämö, L., Jokiranta, T. S., Heikkilä, T., Seppälä, I. J., Viljanen, M., Meri, S. (2001) Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect. Immun.* 69(6):3685–3691.

Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppälä, I., Lahdenne, P., Hefty, P. S., Akins, D., Meri, S. (2002): Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. *J. Immunol.* 1;169(7):3847–3853.

Anderson, C. L., Shen, L., Eicher, D. M., Wewers, M. D., Gill, J. K. (1990): Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* 171:1333–1345.

Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C.P., Shu, H., Shacter, E. (2003): Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Immunol.* 4:87–91.

Anderson, J. F., Johnson, R. C., Magnarelli, L. A., Hyde, F. W. (1986): Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 51(2):394–396.

Anderson, J. F., Magnarelli, L. A. (1984): Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *Yale J. Biol. Med.* 57(4):627–641.

- 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. W., Rincon, M., Kantor, F. S., Fikrig, E.** (2002): Salp15, in *Ixodes scapularis* salivatory protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity.* 16:849-59
- Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C. H., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujji, S., Tanaka, M.** (2011): CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity.* 34:85–95.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K.** (2000): Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau, J., Steinman, R.M.** (1998): Dendritic cells and the control of immunity; *Nature.* 392, 245-252.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Borelin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M., Gromont, 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.
- Bartůněk, P., Bojar, M., Calda, P., Diblík, P., Hercogová, J., Hoza, J., Hulínská, D., Janovská, D., Pícha, D., Valešová, M.** Lymeská borrelióza, Grada 2006, 168s, ISBN 978-80-247-4355-4.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dreksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarström, S., Holmes, K. V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S. H., Lucka, L., Najjar, S. M., Neumaier, M., Obrink, BShively, J. E., Skubitz, K. M., Stanners, C. P., Thomas, P., Thompson, J. A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S., Zimmermann, W.** (1999): Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* 252:243–249

- Beermann, C., Wunderli-Allenspach, H., Groscurth, P., Filqueira, L.** (2000): Lipoproteins from *Borrelia burgdorferi* applied in liposomes and presented by dendritic cells induce CD8+ T-lymphocytes in vitro. *Cell. Immunol.* 201:124–31.
- Benach, J. L., Fleit, H. B., Habicht, G. S., Coleman, J. L., Bosler, E. M., Lane, B. P.** (1984): Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J. Infect. Dis.* 150: 497-507.
- Bhattacharyya, S., Zagórska, A., Lew, E. D., Shrestha, B., Rothlin, C. V., Naughton, J., Diamond, M. S., Lemke, G., Young, J. A.** (2013): Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. *Cell Host Microbe.* 14(2):136-47.
- Blander, J. M., Medzhitov, R.** (2004): Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304:1014.
- Boylan, J. A., Posey, J. E., Gherardini, F. C.** (2003): *Borrelia* oxidative stress response regulator, BosR: a distinctive Zn-dependent transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(20):11684–11689.
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Bradley, C.J., Griffiths, N.J., Rowe, H.A., Heyderman, R.S., Virji, M.** (2005): Critical determinants of the interactions of capsule-expressing *Neisseria meningitidis* with host cells: the role of receptor density in increased cellular targeting via the outer membrane Opa proteins. *Cell. Microbiol.* 7:1490–1503
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y., Gordon, S.** (2002): Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196:407–412.
- Brown, R. N., Lane, R. S.** (1992): Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Science.* 256:1439–1442.
- Burgdorfer, W. A.** (1975): Review of Rocky Mountain spotted fever (tick borne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. *J. Med. Entomol.* 12:269–278.

- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., Davis, J. P.** (1982): Lyme disease, a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., Davis, J. P.** (1982): Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science*. 216:1317-1319.
- Burgdorfer, W., Lane, R. S., Barbour, A. G., Gresbrink, R. A., Anderson, J. R.** (1985): The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*, a vector of *Borrelia burgdorferi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:925-930.
- Carroll, J.A., Garon, C.F., Schwan, T.G.** (1999): Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Immun.* 67:3181-3187.
- Carrasco, Y. R., Batista, F. D.** (2007): B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity*. 27:160-171.
- Casjens, S.** (2000): *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:401-10.
- Cavassani, K.A., Aliberti, J.C., Dias, A.R.V., Silva, J.S., Ferreira, B.R.** (2005): Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 114:235-245
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., Lanzavecchia, A.** (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388(6644):782-7.
- Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A.** (1997): Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10-6.
- Clark, K., Hendricks, A., Burge, D.** (2005): Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2616-2625.
- Coyle, P. K., Schutzer, S. E., Belman, A. L., Krupp, L. B., Golightly, M. G.** (1990): Cerebrospinal fluid immune complexes in patients exposed to *Borrelia burgdorferi*: detection of *Borrelia*-specific and -nonspecific complexes. *Ann. Neurol.* 28(6):739-744.

- Crocker, P. R., Paulson, J. C., Varki, A.** (2007): Siclecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7:255-66.
- Cutler, S. J., Ruzic-Sabljić E., Potkonjak A.** (2016): Emerging borreliae - Expanding beyond Lyme borreliosis. *Mol. Cell. Probes* 10.1016/j.mcp.2016.08.003.
- Cyster, J. G.** (2010): B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat. Immunol.* 11:989–996.
- Daeron, M., Malbec, O., Bonnerot, C., Latour, S., Segal, D. M., Fridman, W. H.** (1994): Tyrosine-containing activation motif-dependent phagocytosis in mast cells. *J. Immunol.* 152:783–792.
- 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.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., Narasimhan, S., Anguita, J., Fikrig, E.** (2009): Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell. Host. Microbe* 19:482-492.
- Das, S., Owen, K. A., Ly, K. T., Park, D., Black, S. G., Wilson, J. M., Sifri, C. D., Ravichandran, K. S., Ernst, P. B., Casanova, J. E.** (2011): Brain angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is a pattern recognition receptor that mediates macrophage binding and engulfment of Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:2136–2141.
- Davis, G. E.** (1992): Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:1025–1031.
- de Silva, A. M., Fikrig, E.** (1995): Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(4):397–404.
- de Silva, A. M., Fish, D., Burkot, T. R., Zhang, Y., Fikrig, E.** (1997): OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect. Immun.* 65(8):3146–3150.
- Defosse, D. L., Johnson, R. C.** (1992): *In vitro* and *in vivo* induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60:1109-1113.

- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., Trombetta, E. S.** (2005): Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*. 307:1630-1634.
- Dennis, V. A., Dixit, S., O'Brien, S. M., Alvarez, X., Pahar, B., Philipp, M. T.** (2009): Live *Borrelia burgdorferi* spirochetes elicit inflammatory mediators from human monocytes via the tolllike receptor signaling pathway. *Inf. Immun.* 77(3):1238–1245
- 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.
- Diamond, M. S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J. K., Corbi, A. L., Springer, T. A.** (1993): The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J. Cell. Biol.* 120:1031–1043..
- Donahue, J. G., Piesman, J., Spielman, A.** (1987): Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:92–96.
- Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S. A., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W. C., Lane, T. F., Cheng, G.** (2004): Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med.* 199:81.
- Driessen, C., Bryant, R. A. R., Lennon-Dumenil, A. M., Villadangos, J. A., Wolf Bryant, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., Ploegh, H. L.** (1999): Cathepsin S Controls the Trafficking and Maturation of Mhc Class II Molecules in Dendritic Cells. *J. Cell. Biol.* 147:775-790.
- Duray, P.H., Steere, A.C.** (1988): Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539, 65-79.
- Edlow, J. A., McGillicuddy, D. C.** (2008): Tick Paralysis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22(3):397-413.
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A.** (1990): Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate

recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med.* 172:1785–1794.

Ferreira, B. R., J. S. Silva. (1999): Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology* 96: 434–439.

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., Pal, U., Chen, M., Anderson, J. F., Flavell, R. A. (2004): OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect. Immun.* 72(3):1755–1759.

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.

Fisher, M. A., Grimm, D., Henion, A. K., Elias, A. F., Stewart, P. E., Rosa, P. A., Gherardini, F. C. (2005): *Borrelia burgdorferi* sigma54 is required for mammalian infection and vector transmission but not for tick colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(14):5162–5167.

Flisiak, R., Pancewicz, S. (2008): Diagnostics and treatment of Lyme borreliosis. Recommendations of Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl. Epidemiol.* 62(1):193-9.

Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2002): Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood.* 99:3602-3612.

Gaforio, J. J., Serrano, M. J., Algarra, I., Ortega, E., de Cienfuegos, G. A. (2002): Phagocytosis of Apoptotic Cells Assessed by Flow Cytometry Using 7-Aminoactinomycin D. *Cytometry.* 49:8-11.

Galy, A., Georgopoulos, K., Wu, L. (1999): Dendritic Cells, Hematopoietic Cell Fate and Development of Dendritic Cells. *Academic. Press.* 3–14.

- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasc, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., Henson, P. M.** (2005): Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 123(2):321–334.
- Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C. A., Charon, N. W.** (1998): Structure and expression of the PlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180(9):418–2425.
- Gern, L., Humair, P. F.,** (1998): Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien. Klin. Wochenschr.* 110(24):856-8.
- Ghiran, I., Barbashov, S. F., Klickstein, L. B., Tas, S. W., Jensenius, J. C., Nicholson-Weller, A.** (2000): Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.* 192:1797–1808.
- Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A., Philipp, M. T.** (1998): *Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys. *Infect. Immun.* 66(6):2691–2697.
- 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(1):411-414.
- Gondolf, K. B., Mihatsch, M., Curschellas, E., Dunn, J. J., Batsford, S. R.** (1994): Induction of experimental allergic arthritis with outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Arthritis Rheum.* 37:1070.
- 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.,** Lyme Borreliosis – Biology, Epidemiology and Control, CABI Publishing 2004, 347s, ISBN 978- 0851996329.
- Gray-Owen, S.D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., Meyer, T.F.** (1997): CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J.* 16:3435-3445.

- Greenberg, M. E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., Hazen, S. L.** (2006): Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 203:2613–2625.
- 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.
- Habicht, G. S., Beck, G., Benach, J. L., Coleman, J. L., Leichtling, K. D.** (1985): Lyme disease spirochetes induce human and murine interleukin 1 production. *J. Immunol.* 134:3147-3154.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Nagata, S.** (2002): Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 417:182–187.
- 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.
- Hauck, C.R., Meyer, T.F., Lang, F., Gulbins, E.** (1998): CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J.* 17:443–454
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., Villadangos, J. A.** (2004): Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* 199:9-26
- 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(11):8427–8435.

Hirschfeld, M., Kirsching, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M., Weis, J. J. (1999): Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163(5):2382–2386.

Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M., Weis, J. J. (1999): Cutting edge: inflammatory signalling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163:2382-2386

Holt, S. C. (1978): Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42:114-160.

Honey, K., Rudensky, A. Y. (2003): Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3:472-482.

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.

Horwitz, M. A. (1984): Phagocytosis of the legionnaires' diseases bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell.* 36:27–33.

Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy Imunologie*, Triton, 2005, 279s, ISBN 80-7254-686-4.

Hovind-Hougen, K. (1974): Electron microscopy of *Borrelia merionesi* and *Borrelia recurrentis*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol Immunol.* 82(6):799-809.

Hovind-Hougen, K. (1984): Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J. Biol. Med.* 57:543-548.

Hovius, J. W. R., van Dam, A. P., Fikrig E. (2007): Tickhost- pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends. Parasitol.* 23:434–438.

Hovius, J. W., de Jong, M. A., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. (2008): Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* 4(2):e31.

Hulínská, D., Volf, P., Grubhoffer, L. (1992): Characterization of *Borrelia burgdorferi* glycoconjugates and surfac carbohydrates. *Zentralbl. Bakteriol.* 276:473-80.

Humair P., Gern L. (2000): The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.* 2(8):915-22.

Humphries, J. D., Byron, A., Humphries, M. J. (2006): Integrin ligands at a glance. *J. Cell. Sci.* 119:3901–3903.

Chang, K. P. (1979): Leishmania donovani: promastigote-macrophage surface interactions in vitro. *Exp. Parasitol.* 48:175-189.

Chen, T., Gotschlich E. C. (1996): CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14851–14856

Chmelař, J., Oliveira, C. J., Řezáčková, P., Francischetti, I. M., Kovářová, Z., Pejler, G., Kopáček, P., Ribeiro, J. M., Mareš, M., Kopecký, J., Kotsyfakis, M. (2011): A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood.* 117:736-44.

Chmelař, J., Oliveira, C. J., Řezáčková, 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.

Choi, S. C., Simhadri, V. R., Tian, L., Gil-Krzewska, A., Krzewski, K., Borrego, F., Coligan, J. E. (2011): Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J. Immunol.* 187(7):3483–3487.

Christe, M., Rutti, B., Brossard, M. (1999): Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.* 85:557–561.

Christe, M., Rutti, B., Brossard, M. (1999): Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.* 85:557-561.

Jílek, P. *Imunologie*, Grada 2005, 96s, ISBN 978-80-247-4822-1.

- Johnson, R. C.** (1977): The spirochetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:89-106.
- Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W.** (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:496–497.
- 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.
- Junt, T., Moseman, E. A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P. A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S. E., Shayakhmetov, D. M., Di Paolo, N. C., van Rooijen, N., Mempel, T. R., Whelan, S. P., von Adrian, U. H.** (2007): Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature.* 450:110–114.
- Kangas, M., Brannstrom, A., Elomaa, O., Matsuda, Y., Eddy, R., Shows, T. B., Tryggvason, K.** (1999): Structure and chromosomal localization of the human and murine genes for the macrophage MARCO receptor. *Genomics.* 58:82.
- Karczewski, J., Endris, R., Connolly, T. M.** (1994): Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 269:6702-6708.
- Karmi, Y., Hovind-Hougen, K., Birch-Andersen, A., Asmar, M.** (1979): *Borrelia persica* and *B. baltazardi* sp. nov.: experimental pathogenicity for some animals and comparisons of the ultrastructure. *Ann. Microbiol.* 130:157-168.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D. M., Jinushi, M., Umetsu, S. E., Butte, M. J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., Sharpe, A. H., Ito, S., Dranoff, G., Kaplan, G. G., Casanovas, J. M., Umetsu, D. T., Dekruyff, R. H., Freeman, G. J.** (2007): TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity.* 27:927–940.
- Kopecký, J., Kuthejlov, M.** (1998): Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunol.* 20:169–174.
- 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.

- Kraal, G., van der Laan, L. J. W. , Elomaa, O., Tryggvason, K.** (2000): The macrophage receptor MARCO. *Microbes. Infect.* 2:313.
- Kraiczy, P., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F., Wallich, R.** (2003): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. *Eur. J. Immunol.* 33(3):697–707.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., Zipfel, P. F.** (2001): Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 69(12):7800–7809
- 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(6):1674–84.
- Kuespert, K., Pils, S., Hauck, C. R.** (2006): CEACAMs – their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:565–571
- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Spenánová, G., Macela, A.** (2001): Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 69:575–578.
- Kýčková, K., Kopecký, J.** (2006): Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J. Med. Entomol.* 43:1208-1214.
- Lane, R. S., Burgdorfer, W., Hayes, S. F., Barbour, A. G.** (1985): Isolation of a spirochete from the soft tick *Ornithodoros coriaceus*: a possible agent of Epizootic Bovine Abortion. *Science.* 230:85-87.
- Lane, R. S., Piesman, J., Burgdorfer, W.** (1991): Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu. Rev. Entomol.* 36:587–609.
- Langhansová, H., Bopp, T., Schmitt, E., Kopecký, J.** (2015): Tick saliva increases production of three chemokines including monocyte chemoattractant protein-1, a histamine-releasing cytokine. *Parasite Immunol.* 37:92-96.

- 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.
- Lennon-Dumenil, A.M., Bakker, A. H., Maehr, R., Fliebig, E., Overkleeft, H. S., Roseblatt, M., Ploegh, H. L., Legaudriere-Gesbert, C.** (2002): Analysis of Protease Activity in Live Antigen-presenting Cells Shows Regulation of the Phagosomal Proteolytic Contents During Dendritic Cell Activation. *J. Exp. Med.* 196:529-540.
- Levin, M., Levine, J. F., Yang, S., Howard, P., Apperson, C. S.** (1996): Reservoir competence of the southeastern five-lined skink (*Eumeces inexpectatus*) and the green anole (*Anolis carolinensis*) for *Borrelia burgdorferi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(1):92–97.
- Levine, J. F., Wilson, M. L., Spielman, A.** (1985): Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:355–360.
- Li, X., Pal, U., Ramamoorthi, N., Liu, X., Desrosiers, D. C., Eggers, C. H., Anderson, J. F., Radolf, J. D., Fikrig, E.** (2007): The Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* requires BB0690, a Dps homologue, to persist within ticks. *Mol. Microbiol.* 63(3):694–710.
- Lipscomb, M.F., Masten, B.J.** (2002): Dendritic Cells: Immune regulators in health and disease; *Physiol. Rev.* 82:97-130.
- Liu, Y. J.** (2005): IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23:275-306
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method. Methods.* 25:4012-8
- Loike, J. D., Sodeik, B., Cao, L., Leucona, S., Weitz, J. I., Detmers, P. A., Wright, S. D., Silverstein, S. C.** (1991): CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:1044–1048.
- Lusitani, D., Malawista, S. E., Montgomery, R. R.** (2002): *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components. *J. Infect. Dis.* 185:179-184.

- Luster, A. D.** (2002): The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14:129–35.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Oglivie, A. L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., Shuler, G.** (1999): An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods.* 223:77-92.
- Ma, Y., Seiler, K. P, Tai, K. F., Yang, L., Woods, M., Weis, J. J.** (1994): Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* stimulate nitric oxide production by the cytokine-inducible pathway. *Infect. Immun.* 62:3663.
- Ma, Y., Weis, J. J.** (1993): *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect. Immun.* 61: 3843
- Madaan, A., Verma, R., Singh, A. T., Jain, S. K., Jaggi, M.** (2014): A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods.* 1:e1.
- 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. Gonorrh. Ven. Dis.* 32:1-18.
- Manoury, B., Mazzeo, D., Li, D. N., Billson, J., Loak, K., Benaroch, P., Watts, C.** (2003): Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity.* 18:489-98.
- Maric, M., Arunachalam, B., Phan, U. T., Dong, C., Garrett, W. S., Cannon, K. S., Alfonso, C., Karlsson, L., Flavell, R. A., Cresswell, P.** (2001): Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science.* 294:1361-5
- McDonald, A. S., Maizels, R. M.** (2008): Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J. Exp. Med.* 205:13-17
- McKinney, E. C., Smith, S. B., H. G. Haines, H. G., Sigel, M. M.** (1977): Phagocytosis by fish cells. *J. Reticuloendothel. Soc.* 21:89-95.

- McKisic, M. D., Barthold, S. W.** (2000): T-cell-independent responses to *Borrelia burgdorferi* are critical for protective immunity and resolution of Lyme disease. *Infect. Immun.* 68(9):5190–5197.
- McWhorter, F. Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., Liu, W. F.** (2013): Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:17253–17258.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr.** (2000): The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8(10):452-6.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., Brossard, M.** (2001): Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* 23:61–69.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., Brossard, M.** (2001): Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* 23: 61-69.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A.** (2013): The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31:563-604.
- Mixson, T. R., Campbell, S. R., Gill, J. S., Ginsberg, H. S., Reichard, M. V., Schulze, T. L., Dasch, G. A.** (2006): Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and Rickettsial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states. *J. Med. Entomol.* 43:1261–1268.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., Nagata, S.** (2007): Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature.* 450:435–439.
- Modollel, M., Schaible, U. E., Rittig, M., Simon, M. M.** (1994): Killing of *Borrelia burgdorferi* by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete. *Immunol. Lett.* 40:139-146.
- Moniuszko, A., Penza, P., Czupryna, P., Pancewicz, S., Zajkowska, J.** (2013): The role of dendritic cells in the pathogenesis of Lyme disease. *Centr. Eur. J. Immunol.* 38(4):569-577.

- Montgomery, R. R., Lusitani, D., de Boisfleury Chevance, A., Malawista, S. E.** (2002): Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 185:1773-1776.
- 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.
- Mosmann, T. R., Sad, S.** (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* 17:138-46.
- Mosser, D. M., Edwards, J. P.** (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:958–969.
- 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.
- Muccioli, M., Pate, M., Omowaleola, O., Benencia, F.** (2011): Generation and Labeling of Murine Bone Marrow-derived Dendritic Cells with Qdot Nanocrystals for Tracking Studies. *J. Vis. Exp.* 52:2785.
- Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S., Hauck, C.R.** (2005): CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 170:825–836
- Munderloh, U. G., Kurtti, T. J.** (1995): Cellular and molecular interrelationships between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* 40:221–243.
- Murthy, P. K., Dennis, V. A., Lasater, B. L., Philipp, M. T.** (2000): Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect. Immun.* 68(12):6663–6669.
- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zing, C., Hanafusa, H., Mizuno, K.** (1996): Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271:30022–30027.
- 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

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(3):e33.

Nobes, C, Marsh, M. (2002): Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr. Biol.* 10:R739-R741

Norgard, M. V., Arndt, L. L., Akins, D. R., Curetty, L. L., Harrich, D. A., Radolf, J. D. (1996): Activation of human monocytic cells by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides proceeds via a pathway distinct from that of lipopolysaccharide but involves the transcriptional activator NF- κ B. *Infect. Immun.* 64:3845.

Norgard, M. V., Riley, B. S., Richardson, J. A., Radolf J. D. (1995): Dermal inflammation elicited by synthetic analogs of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect. Immun.* 63:1507.

Nowakowski, J., McKenna, D., Nadelman, R. B., Bittker, S., Cooper, D., Pavia, C., Holmgren, D., Visintainer, P., Wormser, G. P. (2009): Blood cultures for patients with extracutaneous manifestations of Lyme disease in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 49:1733e5.

Nowakowski, J., Schwartz, I., Liveris, D., Wang, G., Agüero-Rosenfeld, M. E., Girao, G., McKenna, D., Nadelman, R. B., Cavaliere, L. F., Wormser, G. P. (2001): Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin. Infect. Dis.* 33(12):2023-7.

Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., Kaufman, W. R. (1994): Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* 31:1-9

Nuttall, P. A., Labuda, M. (2004): Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* 129:S177-S189.

Ohnishi, J., Piesman, J., de Silva, A. M. (2001): Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(2):670-675.

Olano, J. P., Walker, D. H. (2002): Human ehrlichioses. *Med. Clin. North Am.* 86:375–392

Oschmann, P., Kraiczy, P., Halperin, J., Brade, V. (1999): Lyme borreliosis and tickborne encephalitis. Bremen: UNI-MED

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., Stuart, D. I. (2000). Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1482:92–101

Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., Stuart, D. I.(1999): Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell.* 3:661-671

Pal, U., de Silva, A. M., Montgomery, R. R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J. F., Lobet, Y., Fikrig, E. (2000): Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein. *A. J. Clin. Invest.* 106(4):561–569.

Pal, U., Fikrig, E. (2003): Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes Infect.* 5(7):659–666

Páleníková, J. Interakce buněk přirozené imunity se spirochetami lymeské boreliózy a jejich ovlivnění molekulami klíštěcích slin. České Budějovice, 2012. Diplomová práce. Jihočeská univerzita. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

Páleníková, J., Lieskovská, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Chmelař, J., Kopecký, J. (2015): *Ixodes ricinus* Salivatory Serpin IRS-2 Affects Th17 Differentiation via Inhibition of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway. *Infect. Immun.* 83:1949-1956.

Park, D., Tosello-Tramont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W., Ravichandran, K. S. (2007): BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/ Rac module. *Nature.* 450:430–434.

- Park, S. Y., Jung, M. Y., Kim, H. J., Lee, S. J., Kim, S. Y., Lee, B. H., Kwon, T. H., Park, R. W., Kim, I. S.** (2008): Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 15:192–201.
- Parola, P., Paddock, C. D., Raoult, D.** (2005): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:719–756
- Pashenkov, M., Huang, Y. M., Kostulas, V., Haglund, M., Söderström, M., Link, H.** (2001): Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain.* 124:480-492
- Patel, S. N., Serghides, L., Shith, T. G., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Kurtz, T. W., Pravenec, M., Kain, K. C.** (2004): CD36 mediates the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J. Infect. Dis.* 189:204–213.
- Pausa, M., Pellis, V., Cinco, M., Giulianini, P. G., Presani, G., Perticarari, S., Murgia, R., Tedesco, F.** (2003): Serum-resistant strains of Borrelia burgdorferi evade complement-mediated killing by expressing a CD59-like complement inhibitory molecule. *J. Immunol.* 170(6):3214–3222.
- Peck, A., Mellins, E. D.** (2010): Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect. Immun.* 78(1):32-8.
- Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T., Gordon, S.** (2000): Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect. Immun.* 68:1953–1963.
- Petnicki-Ocwieja, T., Chung, E., Acosta, D. I., Ramos, L. T., Shin, O.S., Ghosh, S., Bozik, L., Li, X., Hu, L. T.** (2013): TRIF Mediates Toll-Like Receptor 2-Dependent Inflammatory Responses to Borrelia burgdorferi. *Infect. Immun.* 81:402-410.
- Petzke, M. M., Brooks, A., Krupa, M. A., Mrodue, D. Schwartz, I.** (2009): Recognition of Borrelia burgdorferi, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I INF response by human immune cells. *J Immunol.* 183:5279-5292.
- Phan, T. G., Grigorova, I., Okada, T., Cyster, J. G.** (2007): Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* 8:992–1000.

- Pierre, P., Mellman, I.** (1998): Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*. 93:1135-1145.
- Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I.** (1997): Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 388(6644):787-92
- Plasterk, R. H., Simon, M. I., Barbour, A. G.** (1985): Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature*. 318(6043):257–263.
- Preac Mursic, V., Wanner, G., Reinhardt, S., Wilske, B., Busch, U., Marget, W.** (1996): Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast L-form variants. *Infection*. 24: 218–25
- Prevot, P. P., Adam, B., Boudjeltia, K. Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E.** (2006): Antihemostatic 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
- Radolf, J. D., Norgard, M. V., Brandt, M. E., Isaacs, R. D., Thompson, P. A., Beutler, B.** (1991): Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. Analysis using a CAT reporter construct. *J. Immunol.* 147:1968-1974
- Ramachandra, R. N., Wikel, S. K.** (1992): Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* 29:818–826.
- 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.

- Ramirez-Ortiz, Z. G., Pendergraft, W. F., 3rd, Prasad, A., Byrne, M. H., Iram, T., Blanchette, C. J., Luster, A. D., Hacohen, N., El Khoury, J., Means, T. K.** (2013): The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol.* 14:917–926.
- Revel, A. T., Blevins, J. S., Almazán, C., Neil, L., Kocan, K. M., de la Fuente, J., Hagman, K. E., Norgard, M. V.** (2005): *bptA* (*bbe16*) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(19):6972–6977
- Ribeiro, J. M.** (1987): *Ixodes dammini*: salivary anticomplement activity. *Exp. Parasitol.* 64:347–353.
- 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., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., Spielman, A.** (1985): Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161:332–344.
- Ribeiro, J. M., Weis, J. J., Telford, S. R., 3rd.** (1990): Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70:382–388.
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Harnisch UK, Hammerschmidt S, Nau R** 2009. Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5alpha and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. *Infect. Immun.* 77:557–564.
- Riese, R. J., Chapman, H. A.** (2000): Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 12:107-113.
- Rittig, M. G., Jagoda, J. C, Wilske, B., Murgia, R., Cinco, M., Repp, R., G. R. Burmester, G. R., Krause, A.** (1998): Coiling Phagocytosis Discriminates between

Different Spirochetes and Is Enhanced by Phorbol Myristate Acetate and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Infect. Immun.* 66:2627-635

Rittig, M. G., Jagoda, J. C., Wilske, B., Murgia, R., Cinco, M., Repp, R., Burmester, G. R., Krause, A. (1998): Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* 66:627–635

Rittig, M. G., Krause, A., Haupl, T., Schaible, U. E., Modolell, M., Kramer, M. D., Lutjendrecoll, E., Simon, M. M., Burmester, G. R. (1992): Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60:4205-4212

Rittig, M. G., Krause, A., Häupl, T., Schaible, U. E., Modolell, M., Kramer, M. D., Lütjen-Drecoll, E., Simon, M. M., Burmester, G. R. (1992): Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60:4205–4212

Rittig, M., Wilske, B., Krause, A. (1999): Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microbes Infect.* 1:727–735

Rock, K. L., Gamble, S., Rothstein, L. (1990): Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science.* 249:918-921.

Rosa, P.A., Tilly, K., Stewart, P.E. (2005): The burgeoning molecular genetics of Lyme disease spirochaete. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:129-143.

Ross, G. D., Reed, W., Dalzell, J. G., Becker, S. E., Hogg, N. (1992): Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *J. Leukoc. Biol.* 51:109–117.

Rothlin, C. V., Carrera-Silva, E. A., Bosurgi, L., Ghosh, S. (2015): TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 33:355–391

Rothlin, C. V., Ghosh S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B., Lemke G. (2007): TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 131(6):1124-36.

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

Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., Haslett, C. (1990): Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343:170–173.

Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermontprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., Amigorena, S. (2006): NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell.* 126:205-18.

Schiff, D. E., Kline, L., Soldau, K., Lee, J. D., Pugin, J., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. (1997): Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 62:786–794.

Schmid, E. T., Pang, I. K., Silva, C. E. A., Bosurgi, L., Miner J. J., Diamond, M. S., Iwasaki A., Rothlin, C. V. (2016): AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *Elife.* e12414

Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Muenzner, P., Hauck, C.R. (2004): Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J. Exp. Med.* 199:35–46

Schmitter, T., Pils, S., Weibel, S., Agerer, F., Buntru, A., Kopp, K., Hauck, C.R. (2007): Opa proteins of pathogenic Neisseriae initiate Src-kinase-dependent or lipid raft-mediated uptake via distinct human CEACAM isoforms. *Infect. Immun.* 75:4116–4126

Schoeler, G. B., Manweiler, S. A., Wikel, S. K. (1999): *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp. Parasitol.* 92: 239-248.

Schoeler, G. B., Manweiler, S. A., Wikel, S. K. (1999): *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp. Parasitol.* 92:239–248.

Schott, M. (2006): Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr. Relat. Cancer.* 13(3):779-95.

- Schutzer, S. E., Coyle, P. K., Belman, A. L., Golightly, M. G., Drulle, J.** (1990): Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet*. 335(8685):312–315.
- Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., Rosa, P. A.** (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 92:2909–2913.
- 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. U. S. A.* 92:2909-2913
- Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., Kopecký, J.** (2008): Development of Th2 responses maturation, and function while promoting tick saliva inhibits dendritic cell migration. *J. Immunol.* 180:6186-6192.
- Slámová, M., Skallová, A., Páleníková, J., Kopecký, J.** (2011): Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite Immunol.* 33:654-660.
- Slámová, M., Skallová, A., Páleníková, J., Kopecký, J.** (2011): Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite Immunol.* 33:654-60.
- Spach, D. H., Liles, W. C., Campbell, G. L., Quick, R. E., Anderson, D. E., Fritsche, T. R.** (1993): Tick borne diseases in the United States. *New. Engl. Med.* 329:936–947
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., Strle, F.** (2012): Lyme borreliosis. *Lancet*. 379:461–473
- Steere, A. C., Coburn, J., Glickstein, L.** (2004): The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 113:1093-101
- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R., Steele, F. M.** (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20:7–17.

- Steere, A.C.** (1989): Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596
- Steinman, R. M.** (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271–296.
- Steinman, R. M.** (2012): Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* 30:1-22.
- Stevens, D. R., Moulton, J. E.** (1978): Ultrastructural and immunological aspects of the phagocytosis of *Trypanosoma brucei* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 19:972-982.
- 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
- Suhonen, J., Komi, J., Soukka, J., Lassila, O., Viljanen, M. K.** (2003): Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 58(1):67–75.
- Sung, S. Y., McDovell, J. V., Carylton, J. A., Marconi, R. T.** (2000): Mutation and recombination in the upstream homology box-flanked ospE-related genes of the Lyme disease spirochetes results in the development of new antigenic variants during infection. *Infect. Immun.* 68:1319–27
- Szkal, A. K., Holmes, K. L., Tew, J. G.** (1983): Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J. Immunol.* 131:1714–1727.
- Takayama, K., Rothenberg, R. J., Barbour, A. G.** (1987): Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 55:2311
- Thomas, C. A., Li, Y., Kodama, T., Suzuki, H., Silverstein, S. C., El Khoury, J.** (2000): Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J. Exp. Med.* 191:147–156.
- Tilly, K., Rosa, P.A., Stewart, P.E.** (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*; *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 22, 217-234

- Toman, M.** *Veterinární Imunologie*. Grada 2009, 392s, ISBN 978-80-247-2464-5
- Undehill, D. M., Goodridge, H. S.** (2012): Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12:492-502
- Underhill, D. M., Ozinsky, A.** (2002): Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825–52.
- van der Laan, L. J., Döpp, E. A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C. D., Gordon, S., Tryggvason, K., Kraal, G.** (1999): Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J. Immunol.* 162:939–947.
- van Spriel, A. B., van den Herik-Oudijk, I. E., van Sorge, N. M., Vile, H. A., van Strijp, J. A., van de Winkel, J. G.** (1999): Effective phagocytosis and killing of *Candida albicans* via targeting FcγRI (CD64) or FcαRI (CD89) on neutrophils. *J. Infect. Dis.* 179:661–669.
- Villadangos, J. A., Young, L.** (2008): Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 29:352-361
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., Watt, S.M.** (1996): Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol. Microbiol.* 22:941–950
- Walker, A. R.** (2001): Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull. Entomol. Res.* 91:69-78.
- Wang, 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
- Wikel, S. K.** (1996): Host immunity to ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 41:1-22.
- Wooten, R. M., Modur, V. R., McIntyre, T. M., Weis, J. J.** (1996): *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor-κB and inflammatory activation in human endothelial cells. *J. Immunol.* 157: 4584

- Wormser, G. P., McKenna, D., Carlin, J., Nadelman, R. B., Cavaliere, L. F., Holmgren, D., Byrne, D. W., Nowakowski, J.** (2005): Brief communication: hematogenous dissemination in early Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 142:751e5.
- Wormser, G. P., Nadelman, R. B., Dattwyler, R. J., Dennis, D. J., Shapiro, E. D., Steere, A. C., Rush, T. J., Rahn, D. W., Coyle, P. K., Persing, D. H., Fish, D., Luft, B. J.** (2000): Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. The Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 31 Suppl 1:1-14.
- Wormser, G.P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klempner, M. S., Krause, P. J., Bakken, J. S., Strle., F., Stanek, G., Bockenstedt, L., Fish, D., Dumler, J. S., Nadelman, R. B.** (2006): The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 1;43(9):1089-134
- Xu, Q., Seemanapalli, S. V., McShan, K., Liang, F. T.** (2006): Constitutive expression of outer surface proteinC diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. *Infect. Immun.* 74:5177–84
- Yakubenko, V. P., Lishko, V. K., Lam, S. C., Ugarova, T. P.** (2002): A molecular basis for integrin alphaMbeta 2 ligand binding promiscuity. *J. Biol. Chem.* 277:48635–48642.
- Yang, X. F., Pal, U., Alani, S. M., Fikrig, E., Norgard, M. V.** (2004): Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* 199(5):641–648.
- Zagorska, A., Traves, P. G., Lew, E. D., Dransfield, I., Lemke, G.** (2014): Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat. Immunol.* 15:920-8
- Zajkowska, J., Lewczuk, P., Strle, F., Stanek, G.** (2012): Lyme borreliosis: from pathogenesis to diagnosis and treatment. *Clin. Dev. Immunol.* 2012: 231657
- 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.
- Zhou, L. J., Tedder, T. F.** (1995): Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154:3821–35.

Zhou, L. J., Tedder, T. F. (1996): CD14 \dagger blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83 \dagger dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2588–92.

Zhu, J., Paul, W. E. (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults, *Blood*. 112(5):1557–69.