

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy
v myších makrofázích. Úloha interferonu- β a oxidu
dusnatého.**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Beránková

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

České Budějovice 2017

Beránková, Z., 2017: Vliv klišťecích slin na replikaci viru klišťové encefalitidy v myších makrofázích. Úloha interferonu- β a oxidu dusnatého. [The effect of tick saliva on the replication of tick borne encephalitis virus in murine macrophages. The role of interferon β and nitric oxide. Mgr. Thesis, in Czech.] – 65 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to characterize the replication of tick borne encephalitis virus in mouse macrophages and investigate the influence of tick saliva derived from *Ixodes ricinus* on the viral replication. Moreover, the effect of interferon β (the member of type I interferons) and nitric oxide on virus replication was studied.

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

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

V Českých Budějovicích dne.....

.....
Zuzana Beránková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat především svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a školitelce specialiste Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. za pomoc a cenné rady, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Velký dík patří rovněž Bc. Evě Výletové, jejíž vstřícnost a ochota mi značně usnadnily práci v laboratoři. Nakonec musím poděkovat také své rodině a příteli a to jak za psychickou podporu, tak i za kritické a podnětné rady při psaní této práce.

OBSAH

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 1 -
1.1. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	- 1 -
1.1.1. Taxonomie a rozšíření	- 1 -
1.1.2. Klinické příznaky klíšťové encefalitidy	- 1 -
1.1.3. Struktura VKE	- 2 -
1.1.4. Přenos VKE	- 3 -
1.1.5. Patogeneze	- 3 -
1.1.6. Replikace VKE v hostitelské buňce	- 4 -
1.2. MAKROFÁGY	- 6 -
1.2.1. Diferenciace a aktivace makrofágů	- 7 -
1.2.2. Úloha makrofágů při virové infekci	- 8 -
1.3. OXID DUSNATÝ	- 9 -
1.3.1. Produkce NO	- 9 -
1.3.2. Úloha NO při virové infekci	- 10 -
1.4. INTERFERONY TYPU I	- 11 -
1.4.1. Exprese IFN typu I	- 12 -
1.4.2. Účinek IFN typu I	- 13 -
1.5. KLÍŠŤEČÍ SLINY	- 15 -
1.5.1. Vliv klíštěcích slin na hemostázu	- 15 -
1.5.2. Vliv na imunitní odpověď hostitele	- 16 -
1.5.3. Vliv klíštěcích slin na přenos patogenů	- 18 -
2. CÍLE PRÁCE	- 19 -
3. MATERIÁL A METODY	- 20 -
3.1. MATERIÁL	- 20 -
3.1.1. Buněčné linie	- 20 -
3.1.2. Myši	- 20 -
3.1.3. Virus klíšťové encefalitidy	- 20 -
3.1.4. Klíštěcí sliny	- 21 -
3.1.5. Inhibitory	- 21 -
3.2. METODY	- 21 -
3.2.1. Replikace VKE v makrofázích a její ovlivnění klíštěcími slinami	- 21 -
3.2.2. Zastoupení infikovaných buněk u jednotlivých skupin makrofágů	- 24 -
3.2.3. Produkce oxidu dusnatého v infikovaných makrofázích	- 26 -
3.2.4. Produkce IFN- β v infikovaných makrofázích a její ovlivnění klíštěcími slinami	- 27 -
3.2.5. Vliv inhibitorů na replikaci VKE a produkci IFN- β v infikovaných makrofázích	- 27 -

3.2.6. Přežívání a apoptóza infikovaných makrofágů ovlivněných klíštěcími slinami	- 28 -
3.2.7. Statistické vyhodnocení dat	- 29 -
4. VÝSLEDKY	- 30 -
4.1 Replikace VKE v makrofázích a její ovlivnění slinami	- 30 -
4.2. Zastoupení infikovaných buněk u jednotlivých skupin makrofágů	- 33 -
4.3. Produkce oxidu dusnatého v infikovaných makrofázích	- 35 -
4.4. Produkce IFN- β v infikovaných makrofázích a její ovlivnění klíštěcími slinami	- 36 -
4.5. Vliv inhibitorů na replikaci VKE a produkci IFN- β v infikovaných makrofázích	- 39 -
4.6. Přežívání a apoptóza infikovaných makrofágů ovlivněných klíštěcími slinami	- 41 -
5. DISKUZE	- 44 -
6. ZÁVĚR	- 52 -
7. SEZNAM ZKRATEK	- 53 -
8. SEZNAM LITERATURY	- 55 -
9. PŘÍLOHY	- 64 -

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) se řadí do skupiny arbovirů (tj. virů přenášených krev sajícími členovci) a je původcem závažného neuroinfekčního onemocnění nazývaného klíšťová encefalitida. Vektorem VKE jsou klíšťa z čeledi Ixodidae (především *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*), prostřednictvím nichž je virus přenášen na cílové hostitele. V posledních letech dochází ke stálému zvětšování areálu rozšíření VKE a ročně jsou zaznamenány tisíce případů klíšťové encefalitidy v Evropě a až 10 000 případů v Rusku a na Dálném východě (Mansfield et al. 2009; Dörrbecker et al. 2010).

1.1.1. TAXONOMIE A ROZŠÍŘENÍ

Taxonomicky se VKE řadí do rodu *Flavivirus*, do čeledi Flaviviridae, která zahrnuje okolo 70 různých druhů virů. Kromě VKE patří do skupiny flavivirů i další medicínsky významné patogeny, jako jsou např. virus dengue, virus japonské encefalitidy, virus západního Nilu či virus žluté zimnice. Flaviviry lze dělit do několika podskupin, přičemž VKE se řadí mezi viry komplexu klíšťových encefalitid. Viry z této skupiny jsou si navzájem geneticky i antigenně příbuzné a všechny mají společného přenašeče – klíšť. Kromě VKE lze z dalších virů, které patří do této skupiny, jmenovat např. virus horečky Kyasanurského lesa, virus Omské hemoragické horečky, virus Powassan, virus vrtivky či virus Langat (Grard et al. 2007).

VKE lze na základě sekvenční a serologické analýzy rozlišit na tři základní subtypy - evropský, sibiřský a dálnévýchodní (Ecker et al. 1999). Evropský subtyp je přenášen klíšťem *I. ricinus* a je rozšířen na většině území Evropy. Sibiřský subtyp se vyskytuje na území Sibiře, Finska a Baltských států a jako vektor mu slouží klíšť *I. persulcatus*. Stejného přenašeče využívá i dálnévýchodní subtyp VKE, který se objevuje ve střední a východní části Asie včetně Číny a Japonska (Dörrbecker et al. 2010).

Jednotlivé subtypy VKE se neliší pouze geografickým rozšířením či druhem přenašečů. Zásadní rozdíl je patrný i v klinických příznacích onemocnění, jež způsobují.

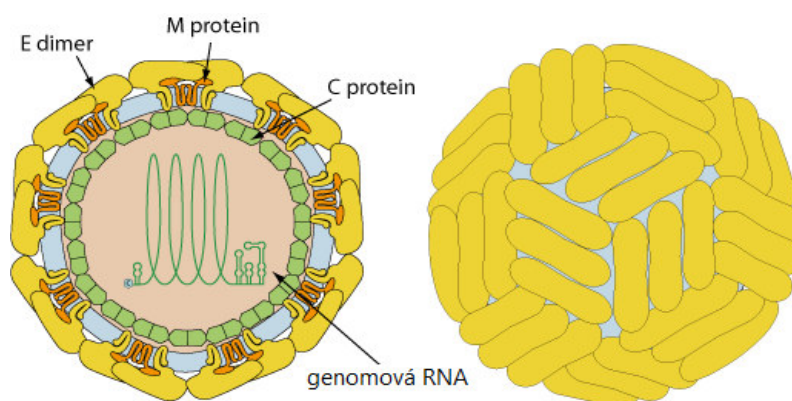
1.1.2. KLINICKÉ PŘÍZNAKY KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Onemocnění způsobené evropským subtypem VKE mívá ve většině případů asymptomatický průběh. V případě klinicky aparentní infekce je typický dvoufázový průběh

onemocnění, kdy po uplynutí inkubační doby (1-2 týdny) nastupuje viremická fáze projevující se nespecifickými chřipkovými příznaky, které zahrnují bolest hlavy a svalů, horečku či únavu. První fáze je často následována asymptomatickou periodou trvající 2 až 10 dní, během níž dochází k invazi viru do centrální nervové soustavy (CNS). Po bezpříznakovém období následuje druhá fáze onemocnění vyznačující se především meningitidou a meningoencefalitidou s možností následného vzniku postencefalitického syndromu. Letalita je u onemocnění způsobeného evropským subtypem nízká a pohybuje se v rozmezí 1-2 % (Dörrbecker et al. 2010). Na druhou stranu onemocnění vyvolané dálnévýchodním subtypem mívá v 85 % jednofázový průběh a bývá neuroinvazivnější s vyšším počtem závažných neurologických komplikací. Letalita přitom dosahuje až 30 % (Dörrbecker et al. 2010).

1.1.3. STRUKTURA VKE

Virové částice VKE mají velikost přibližně 50 nm a skládají se z nukleokapsidy a fosfolipidového obalu, který nukleokapsidu obklopuje a který obsahuje obalový glykoprotein E a membránový protein M (viz obr. 1). Nukleokapsida se skládá z kapsidového proteinu C a jednovláknové molekuly RNA s pozitivní polaritou ((+)ssRNA) o velikosti 11-12 kb. Genom kóduje jeden otevřený čtecí rámeček (ORF), který je obklopen 5' a 3' nekódujícími oblastmi. ORF je překládán do jednoho polyproteinu skládajícího se z přibližně 3 400 aminokyselin. Polyprotein je následně za pomoci proteáz naštípán na jednotlivé virové proteiny - tři strukturální a sedm nestrukturních. Mezi strukturální proteiny patří již zmíněný kapsidový protein C, prekurzor membránového proteinu M (prM) a glykoprotein E. Nestrukturní proteiny kódované genomem VKE jsou NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Lindquist & Vapalahti 2008).



Obr. 1: Struktura virionu flavivirů (zdroj: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html).

1.1.4. PŘENOS VKE

Přenos viru klíšťové encefalitidy je určen vzájemným vztahem mezi virem, klíštětem a klíštěcím hostitelem. Hlavními hostiteli a zároveň důležitým rezervoárem VKE jsou drobní hlodavci, ve kterých je virus schopný se nejen úspěšně množit, ale i přetrvávat, přičemž může docházet k jeho přenosu na klíšťata. Přenos z infikovaného klíštěte na neinfikované je možný jak transovariálně, kdy dochází k přenosu viru z infikované dospělé samice na další generaci, tak i během sání neinfikovaného klíštěte na infikovaném viremickém hostiteli (Dörrbecker et al. 2010).

Jako nejdůležitější cesta přenosu v přírodě se ovšem zdá být přenos z infikovaného klíštěte na neinfikované během tzv. sousání (angl. *co-feeding*), kdy dvě klíšťata sají v těsné blízkosti vedle sebe. V tomto případě je přenos možný i při sání na hostiteli s nedetekovatelnou nebo velmi nízkou hladinou virémie (Labuda et al. 1993a; Labuda et al. 1993b). Důležitou roli v přenosu VKE mezi sousajícími klíšťaty hraje příliv leukocytů (konkrétně Langerhansových buněk, neutrofilů či buněk z monocyto/makrofágové řady) do místa sání klíštěte. Může docházet k infekci těchto imunitních buněk, replikaci viru a následnému roznesení viru prostřednictvím migrujících buněk do dalších míst sání klíšťat (Labuda et al. 1996). Zároveň bylo prokázáno, že klíštěcí sliny uvolňované během sání do rány v kůži hostitele zvyšují účinnost tohoto přenosu (Labuda et al. 1993c).

V případě, že je klíště infikováno VKE, zůstává nakažené po celou dobu svého životního cyklu. Poté, co se klíště nakazí během sání, dochází k replikaci viru v buňkách střevní stěny. Odtud se následně virus dostává do slinných žláz, ze kterých je spolu se slinami uvolňován během sání na novém hostiteli (Nuttall et al. 1994).

1.1.5. PATOGENEZE

Infekce VKE se u člověka nejčastěji objevuje jako důsledek sání infikovaného klíštěte. Byly ovšem zaznamenány i nákazy konzumací nepasterizovaného mléka od infikovaných koz, krav či ovcí (Růžek et al. 2010). V případě nákazy prostřednictvím infikovaného klíštěte je virus do lidského těla transportován pomocí klíštěcích slin, které jsou během sání vylučovány do rány. K přenosu viru dochází již během prvních minut po přisátí klíštěte, postupem času se ovšem množství viru ve slinách zásadně zvyšuje a to 10krát až 100krát (Alekseev & Chunikhin 1990 ex Lindquist & Vapalahti 2008).

Po vstupu VKE do organismu přichází virové částice do styku s buňkami vyskytujícími se v kůži, které mohou být VKE infikovány. Významnou roli hrají zejména dendritické

buňky, makrofágy a neutrofilů, které jsou náchylné k infekci VKE a mohou tak sloužit jako místo pro pomnožení viru a napomáhat tím jeho následnému šíření z místa přisátí infikovaného klíštěte do krevního oběhu. Nejdůležitější úlohu při transportu viru mají zřejmě Langerhansovy buňky, pomocí nichž je VKE dopravován do spádových lymfatických uzlin (Haglund & Günther 2003). V lymfatických uzlinách dochází k virové replikaci a transportu do krve s výsledným vznikem virémie. Prostřednictvím krve je virus roznášen do dalších orgánů, především do orgánů retikuloendotelového systému, tj. do sleziny, jater a kostní dřeně). Při déletrvající virémii může dojít k překonání hematoencefalitické bariéry a invazi do CNS (Mansfield et al. 2009; Růžek et al. 2010).

1.1.6. REPLIKACE VKE V HOSTITELSKÉ BUŇCE

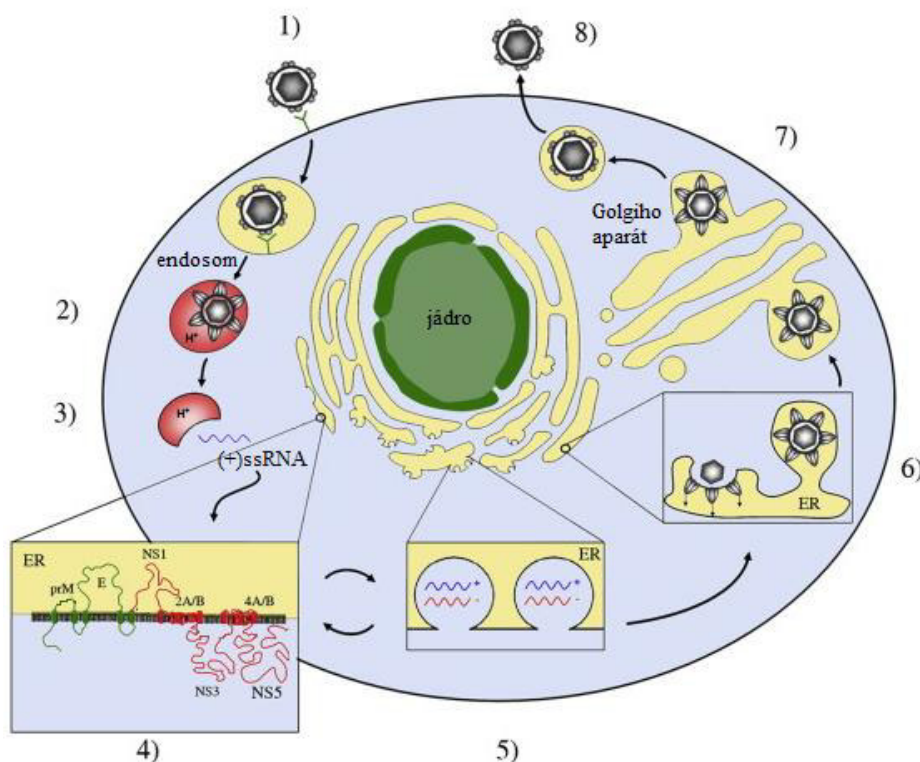
K přichycení VKE na povrch hostitelské buňky dochází prostřednictvím E proteinu, který tvoří obal virové částice. S přichycením flavivirů na povrch buňky jsou spojovány některé struktury (např. glykosaminoglykany - př. heparansulfát) či receptory, které zprostředkovávají nejen přichycení, ale i vstup virů do buňky. Mezi takové receptory patří např. lektinové receptory C-typu (př. DC-SIGN) exprimované na makrofázích a dendritických buňkách nebo fosfatidylserinové receptory (Perera-Lecoin et al. 2013).

Po přichycení na povrch vstupuje virion do buňky pomocí klatrin-dependentní endocytózy. Nízké pH v endosomu způsobí konformační změny ve struktuře E proteinu, které následně vedou k membránové fúzi a uvolnění nukleokapsidy a virové RNA do cytoplasmy. Poté dochází na membráně endoplasmatického retikula (ER) k translaci virového genomu a vzniká polyprotein, který je následně štípán pomocí buněčných enzymů a virové NS2B/NS3 proteázy na tři strukturální a sedm nestrukturálních virových proteinů.

Po translaci genomové RNA dochází pomocí NS5 (RNA-dependentní RNA polymeráza) k syntéze komplementárního negativního vlákna RNA, které slouží jako předloha pro syntézu (+)ssRNA. Nově syntetizované vlákno (+)ssRNA je použito k translaci virových proteinů, k replikaci nových RNA vláken nebo je zabudováno do nově vznikajících virových částic (Carletti et al. 2017).

Replikace VKE se odehrává v membránových strukturách, které jsou po infekci VKE tvořeny na ER. Tyto membránové struktury v podobě váčků jsou v buňce situovány zejména v perinukleární oblasti a představují ochranu před rozpoznáním replikačního meziprojektu (tj. dvouvláknové RNA neboli dsRNA) imunitními mechanismy hostitele (Miorin et al. 2013; Överby et al. 2010).

V lumen ER jsou virové částice zkompletovány a poté jsou dále upravovány v Golgiho aparátu, kde dochází k posttranslačním modifikacím a ke štěpení prM za vzniku membránového proteinu M. Zralé viriony jsou transportovány skrze sekreční dráhu a uvolněny na povrch buňky (Carletti et al. 2017).



Obr. 2: Replikace flavivirů v hostitelské buňce (převzato z Fernandez-Garcia et al. 2009).

- 1) Virion vstupuje do buňky pomocí receptorem zprostředkované endocytózy.
- 2) V endosomu dochází pod vlivem nízkého pH k membránové fúzi.
- 3) Virová genomová RNA je uvolněna do cytoplasmy.
- 4) Virová RNA je translatována na membráně ER a vzniká polyprotein.
- 5) Replikace viru se odehrává v membránových strukturách na ER.
- 6) V lumen ER vznikají nové viriony.
- 7) Nezralé viriony jsou posttranslačně upravovány v Golgiho aparátu.
- 8) Zralé viriony jsou uvolňovány z buňky prostřednictvím exocytózy.

Hostitelské buňky v reakci na virové infekce vyvinuly řadu mechanismů, pomocí nichž mohou detekovat a následně zneškodnit virové částice. V počátcích replikace hrají důležitou roli především přirozené imunitní mechanismy (např. produkce prozánětlivých cytokinů a interferonů typu I). Buňkami přirozené imunity, které se podílejí na likvidaci patogenů krátce po jejich proniknutí do organismu, jsou např. makrofágy (Dörrbecker et al. 2010).

1.2. MAKROFÁGY

Makrofágy jsou buňky imunitního systému a představují jednu ze základních složek přirozené imunity. Uplatňují se především jako antigen prezentující buňky a profesionální fagocyty, které jsou zodpovědné za rozpoznání a následnou likvidaci patogenů či mrtvých buněk. Makrofágy se účastní nejen přirozených, ale i adaptivních imunitních mechanismů a hrají nepostradatelnou roli v průběhu mnoha onemocnění (Geissmann et al. 2010).

Makrofágy se řadí mezi leukocyty a v organismu mohou vznikat dvěma různými způsoby. V prvním případě vznikají stejně jako ostatní leukocyty v kostní dřeni. Zde jsou tvořeny z hemopoetických progenitorových buněk, které mohou být buď přímo přeměněny na makrofágy, nebo dochází nejprve k diferenciaci hemopoetických buněk na monocyty. Ty jsou uvolňovány do krevního oběhu, kde cirkulují po dobu několika dní, a poté vstupují do tkání, v nichž jsou přeměňovány na jednotlivé subpopulace tkáňových makrofágů (Gordon & Martinez 2010).

Kromě výše popsaného mechanismu vzniku makrofágů, který byl po dlouhou dobu považován za hlavní, byl charakterizován i druhý způsob. Bylo zjištěno, že mnoho populací tkáňových rezidentních makrofágů je tvořeno z embryonických prekurzorů vznikajících ve žlutkovém váčku. Tyto prekurzory se vytvářejí v tkáni ještě před narozením a jsou pak udržovány v průběhu dospělosti nezávisle na prekurzorech z kostní dřene (Perdigueru et al. 2015).

Tkáňové rezidentní makrofágy jsou trvale přítomné v různých orgánech, kde plní především homeostatickou funkci. Odstraňují zde staré či apoptické buňky, přispívají k obnově tkáně poškozené v průběhu zánětu a rovněž představují „pohotovostní jednotky“ pro případ, že dojde ke zranění či k propuknutí infekce. Jednotlivé subpopulace makrofágů se mezi sebou navzájem fenotypově liší v závislosti na konkrétních orgánech, ve kterých se vyskytují. Odlišné makrofágy lze nalézt např. v játrech (Kupfferovy buňky), plicích (alveolární makrofágy), mozku (mikroglie), slezině či střevě (Gordon & Martinez 2010; Geissmann et al. 2010).

1.2.1. DIFERENCIACE A AKTIVACE MAKROFÁGŮ

K diferenciaci monocytů na makrofágy dochází zejména pod vlivem růstových faktorů, jako jsou např. GM-CSF a M-CSF (Parihar et al. 2010). Vzniklé makrofágy jsou následně aktivovány a to dvěma základními mechanismy.

Působením IFN- γ nebo LPS dochází ke klasické aktivaci makrofágů, která dává vznik prozánětlivým M1 makrofágům, které podporují IL-12 zprostředkovanou T_H1 imunitní odpověď. Naopak působením IL-4 a IL-13 vznikají alternativně aktivované makrofágy (M2 typ), jež podporují T_H2 imunitní odpověď (Gordon & Martinez 2010). Některé makrofágy však nevykazují čistě M1 nebo M2 fenotyp a na aktivaci makrofágů se začíná pohlížet více jako na komplexnější model zahrnující rovněž signály, kterým jsou vystaveny makrofágy ve svém konkrétním mikroprostředí (Ginhoux et al. 2016).

Aby byla aktivace makrofágů úspěšná, je kromě stimulu prostřednictvím cytokinů zapotřebí ještě druhého signálu. Ten nejčastěji vzniká poté, co dojde k rozpoznání patogenu prostřednictvím specifických receptorů rozeznávajících struktury typické pro patogeny (PRR). Makrofágy exprimují na svém povrchu celou řadu PRR, např. Toll-like receptory (TLR), RIG-I-like receptory (RLR), Nod-like receptory či scavengerové receptory (Parihar et al. 2010).

Aktivované makrofágy migrují do místa infekce či poranění a uvolňují do okolí pestrou škálu látek, čímž přispívají k likvidaci patogenů a ke vzniku akutního nebo chronického zánětu. Ze sekretovaných látek lze jmenovat antibakteriální a proteolytické enzymy, různé chemokiny či velké množství cytokinů, které mohou být jak prozánětlivé (např. IL-1 β , TNF a IL-6), tak protizánětlivé (např. IL-10 a TGF- β). Neméně významná je i produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (Gordon & Martinez 2010).

Po splnění jejich funkce dochází k deaktivaci makrofágů, během níž podstupují funkční změny, které zajistí, aby mohly opět zastávat úlohu rezidentních makrofágů (Gordon & Martinez 2010).

1.2.2. ÚLOHA MAKROFÁGŮ PŘI VIROVÉ INFEKCI

Makrofágy přispívají k boji proti virům několika způsoby. Makrofágy jsou důležitými fagocytujícími buňkami a jejich schopnost fagocytovat volné nebo opsonizované virové částice hraje významnou roli při vypořádávání se s virovými patogeny (Mercer & Greber 2013).

Jakožto antigen prezentující buňky jsou makrofágy schopné prezentovat antigen lymfocytům a podílejí se tak na vzniku adaptivní imunity vůči virovým infekcím. Makrofágy exprimují na svém povrchu jak MHC I receptory, které stimulují CD8⁺ T lymfocyty a jejich cytotoxické efektorové mechanismy, tak MHC II receptory, které aktivují T_H lymfocyty, B lymfocyty a produkci imunoglobulinových protilátek. MHC I receptory jsou však v průběhu diferenciaci makrofágů často inhibovány a dochází spíše k expresi MHC II (Parihar et al. 2010).

Makrofágy jsou schopné sekretovat cytokiny, chemokiny a další látky, které zamezují množení viru a infekci okolních buněk. Mezi takové látky patří např. TNF- α , IL-1 či IL-12, které přispívají k přirozené imunitní odpovědi v časně fázi virové replikace. Rovněž napomáhají rozvoji antigen specifické odpovědi v pozdější fázi infekce (Burke & Lewis 2002). Velmi důležitou roli zastávají interferony typu I (viz kapitola 1.4.). Pozornost je věnovaná rovněž oxidu dusnatému (viz následující kapitola), který přesto, že je jeho účinek spojován spíše s bojem proti bakteriálním infekcím, zastává neopomenutelnou roli i v likvidaci virových patogenů.

Navzdory nepostradatelné úloze makrofágů v obraně proti patogenům je potřeba zmínit, že aktivace makrofágů a jejich schopnost produkovat velké množství bioaktivních látek může rovněž v určitých situacích způsobovat poškozování tkáně či jiné narušování fyziologických pochodů a přispívat tak k rozvoji patogeneze onemocnění (Burke & Lewis 2002).

1.3. OXID DUSNATÝ

Oxid dusnatý (NO) je za normálních podmínek volný radikál, který má v organismu značný biologický význam. Zásadně se podílí nejen na fyziologických pochodech, během kterých se uplatňují jeho vaskulární a neuronální účinky, ale je rovněž zahrnut v imunitní odpovědi. Obranných mechanismů hostitele se účastní především jako velmi účinné mikrobicidní činidlo, ale neméně významný je i jeho podíl na regulaci imunitní odpovědi. V závislosti na vyprodukovaném množství může mít NO vliv na aktivaci různých signálních drah, na diferenciaci i funkci T-lymfocytů a rovněž může ovlivňovat humorální odpověď (Uehara et al. 2015).

1.3.1. PRODUKCE NO

NO je produkován řadou imunitních buněk (dendritické buňky, NK buňky, makrofágy, eozinofily, neutrofilny), ale k jeho vzniku dochází i v neimunitních buňkách, jako jsou např. endoteliální či epiteliální buňky, fibroblasty nebo keratinocyty (Akaike & Maeda 2000; Uehara et al. 2015).

NO je tvořen během L-argininového metabolismu a to za pomoci enzymů nazývaných syntázy oxidu dusnatého čili NO syntázy (Knowles & Moncada 1994). NO syntáza (NOS) je enzym, který za přítomnosti NADPH a O_2 přeměňuje L-arginin na NO. U savců existují tři izoformy NOS – dvě konstitutivní a jedna indukibilní. Konstitutivní izoformy se rozlišují na neuronální NOS (nNOS), jež se vyskytuje v neuronech, a endotelovou (eNOS), kterou lze nejčastěji nalézt v endoteliálních buňkách. nNOS a eNOS hrají důležitou roli během základních pochodů v organismu (např. během vasodilatace) a produkují pouze malé množství NO. Naopak indukibilní NOS (iNOS) je schopna v krátkém časovém intervalu vyprodukovat velké množství NO a díky tomu je to právě iNOS, jež hraje důležitou roli v imunitní odpovědi hostitele (Alderton et al. 2001).

K expresi iNOS dochází na základě různých stimulů, kterými nejčastěji bývají mikrobiální produkty či cytokiny. Signální dráha vedoucí k indukci produkce iNOS může být spuštěna prostřednictvím aktivace TLR, jež rozpoznávají molekulární struktury typické pro patogenní mikroorganismy (tzv. PAMP). Stejná signální dráha je aktivována i pomocí některých cytokinů (IL-1 β) či TNF- α . K indukci exprese rovněž může dojít prostřednictvím dráhy spuštěné po navázání IFN- γ . Na druhou stranu některé cytokiny produkované T_H2 lymfocyty (IL-4, IL-5) a supresivní cytokiny (např. IL-10, TGF- β) mohou expresi iNOS inhibovat (Uehara et al. 2015).

1.3.2. ÚLOHA NO PŘI VIROVÉ INFEKCI

I když je NO znám především pro svůj antimikrobiální účinek uplatňující se u bakteriálních onemocnění, jeho imunomodulační schopnosti byly pozorovány i v případě virových infekcí.

Během virové infekce může docházet ke vzniku NO indukci iNOS hned dvěma způsoby a to buď přímo, kdy samotná přítomnost virových částic či virová replikace spouští expresi iNOS, nebo nepřímo, kdy je za zvýšení exprese iNOS zodpovědný určitý mediátor, který je při infekci produkován – např. IFN- γ (Akaike & Maeda 2000; Abdul-Cader et al. 2016).

Je velmi dobře zdokumentováno, že NO hraje u řady virových infekcí protektivní roli a podílí se na eliminaci viru. Antivirotický účinek NO byl prokázán např. v případě viru vezikulární stomatitidy (Bi & Reiss 1995), viru Japonské encefalitidy (Lin et al. 1997), dengue viru (Takhampunya et al. 2006) či Cocksackie viru (Saura et al. 1999).

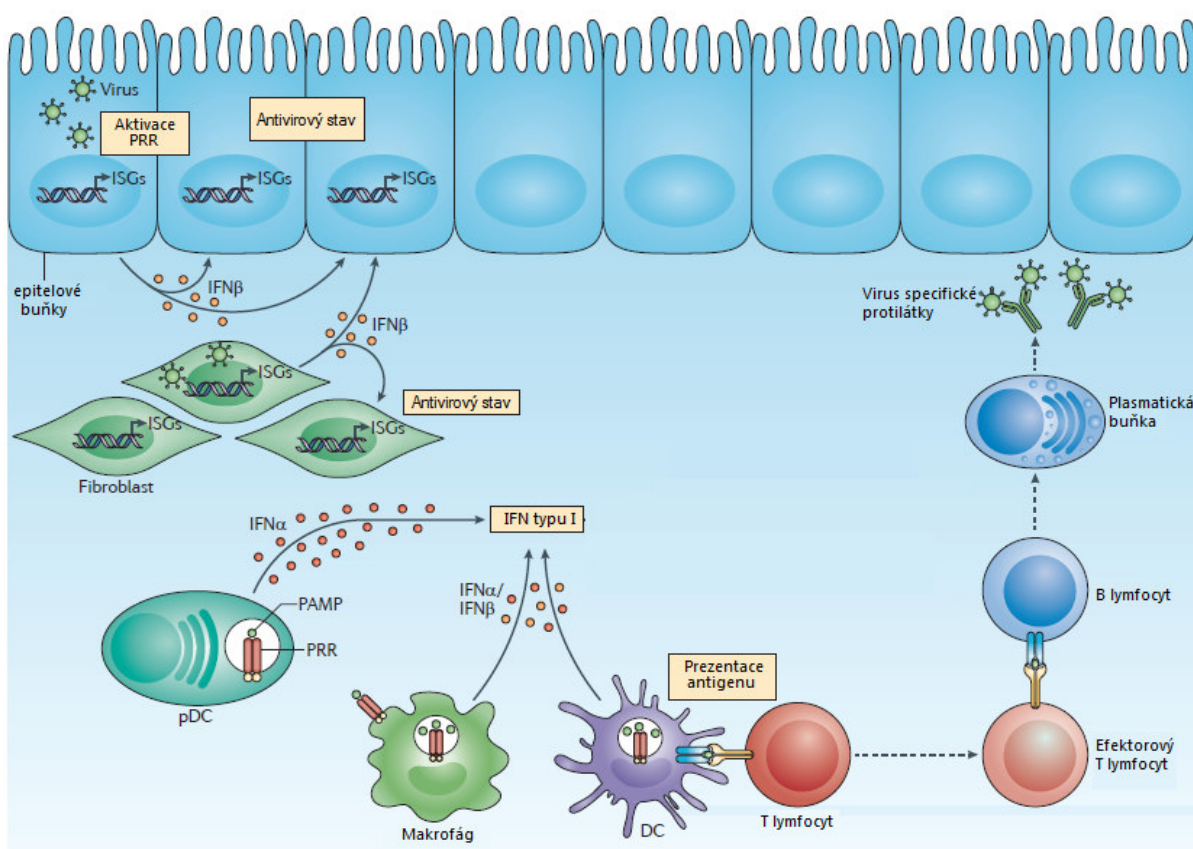
Díky tomu, že je NO značně nestabilní volný radikál, může reagovat s makromolekulami a způsobovat tím strukturní i funkční modifikace. Například reakce NO s cysteiny, které jsou přítomné v důležitých virových proteinech (př. v proteázách potřebných pro našťípání virových polyproteinů), může vést ke snížení virové replikace a narušení životního cyklu virů. Tento způsob antivirotického působení NO byl zdokumentován např. u viru Cocksackie (Saura et al. 1999).

Přestože NO zastává u mnoha infekcí obrannou úlohu, u jiných byl naopak prokázán jeho nepříznivý účinek, kdy přítomnost NO způsobuje vznik zánětu, zhoršení stavu pacientů či přispívá k přetrvávání infekce. Nežádoucí účinky NO se projevují zejména v případě infekcí, během kterých dochází k proniknutí viru do CNS, jak bylo prokázáno např. u viru dengue (de Souza et al. 2013). Neméně škodlivý efekt může představovat oxidativní stres způsobený NO, jenž může vést k vážným imunopatologiím a dokonce až k buněčné či orgánové dysfunkci (Akaike & Maeda 2000).

1.4. INTERFERONY TYPU I

Interferony (IFN) typu I zahrnují skupinu polypeptidů sekretovaných infikovanými buňkami při obraně proti virovým infekcím. Lze je rozdělit do sedmi rodin: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ a IFN- τ . Sekrece IFN- α a IFN- β zastává mezi zmíněnými interferony nejvýznamnější úlohu (Pestka et al. 2004).

IFN typu I mají v boji organismu proti šířícím se patogenům tři hlavní funkce. Zaprvé jsou u infikovaných (ale zároveň i u neinfikovaných sousedních buněk) schopny indukovat antimikrobiální stav, čímž do značné míry zamezují šíření infekčních agens, zejména pak virových patogenů. Dále mají zásadní vliv na přirozenou složku imunitní odpovědi, kterou mohou modulovat takovým způsobem, že u imunitních buněk dochází ke zvýšení schopnosti prezentovat antigen a zlepšení cytotoxických funkcí. Zatřetí aktivují adaptivní složku imunity tím, že se podílejí na rozvoji imunitní odpovědi zprostředkované T i B lymfocyty a pomáhají vytvářet imunologickou paměť (Ivashkiv & Donlin 2014).



Obr. 3: Schematické znázornění působení IFN typu I (převzato z Ivashkiv & Donlin 2014).

1.4.1. EXPRESE IFN TYPU I

Virové částice jsou rozpoznávány prostřednictvím receptorů, které jsou schopné detekovat virové nukleové kyseliny a následně spouštět expresi IFN typu I. Téměř všechny buňky, u nichž dojde k infekci, jsou schopné rozpoznávat PAMP a to prostřednictvím PRR, jako jsou cytoplasmatické RIG-I-like receptory nebo membránové Toll-like receptory. První typ receptorů (RLR) je exprimován u většiny typů buněk a slouží k detekci nukleových kyselin vznikajících po virové infekci v cytosolu buněk. Druhá skupina receptorů (TLR) rozpoznává virové nukleové kyseliny nikoliv v cytosolu, ale v endosomech a tento způsob detekce patogenů je umožněn jen některým specializovaným buňkám, jako jsou např. makrofágy či dendritické buňky (Takeuchi & Akira 2009).

Toll-like receptory

TLR je skupina receptorů sestávající z membránových proteinů schopných rozeznávat cizí a tedy potenciálně nebezpečné struktury – tzv. PAMP. Jednotlivé TLR rozeznávají různé PAMP a zpočátku byly intenzivně zkoumány jakožto signální receptory, které se podílejí na aktivaci imunitní odpovědi ve vztahu k mikrobiálnímu stimulu. TLR jsou však rovněž schopné rozpoznávat různé druhy nukleových kyselin, což z nich dělá účinný nástroj v detekci většiny typů virů (García-Sastre & Biron 2006).

Důležitou roli při rozeznávání virových produktů hrají konkrétně receptory TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9. Dvouvláknová RNA, která vzniká během replikace DNA i RNA virů, je rozeznávána pomocí TLR3 (Alexopoulou et al. 2001). TLR7 a TLR8 rozpoznávají ssRNA a viry jejichž genom je ssRNA tvořen (Heil et al. 2004). Virová DNA je detekována pomocí TLR9 (Krug et al. 2004). Všechny tyto čtyři TLR jsou na rozdíl od ostatních TLR, které jsou lokalizované na buněčném povrchu, umístěny v buněčných endosomech a do kontaktu s virovými nukleovými kyselinami přicházejí po jejich proniknutí do buňky prostřednictvím endozomu (v případě TLR7/8/9), nebo jakožto produkty po virové replikaci z lyzovaných či apoptických buněk (v případě TLR3) (García-Sastre & Biron 2006).

RIG-I-like receptory

Přestože jsou TLR exprimované pouze u některých specializovaných buněk, jsou téměř všechny jaderné buňky schopny odpovídat na virovou infekci prostřednictvím produkce IFN typu I. Tato skutečnost je zajištěna tím, že existuje na TLR nezávislá aktivace interferonové produkce. Ta je realizována pomocí RIG-I-like receptorů, které jsou na rozdíl od TLR

lokalizované v cytoplasmě a prozatím byly popsány dva typy - RIG-I (z angl. *retinoic acid-inducible gene 1*) a MDA5 (z angl. *melanoma differentiation-associated gene 5*) (Yoneyama et al. 2004).

Po rozpoznání virové nukleové kyseliny prostřednictvím zmíněných receptorů dochází k aktivaci několika různých signálních drah, které se liší v závislosti na konkrétním druhu receptoru, jenž danou dráhu spustil. Signální dráhy následně vedou k aktivaci transkripčních faktorů (např. IRF3, IRF7, NF- κ B, AP-1), které indukují expresi genů pro IFN typu I (McNab et al. 2015).

1.4.2. ÚČINEK IFN TYPU I

Poté, co dojde na základě rozpoznání virové nukleové kyseliny k produkci IFN- α a IFN- β , vážou se sekretované interferony na transmembránový receptor označovaný jako IFN- α receptor (IFNAR), který se skládá se dvou podjednotek – IFNAR1 a IFNAR2 (Brierley & Fish 2002).

Vazba na IFNAR spouští aktivaci několika drah. Hlavní dráhou je JAK/STAT signální dráha (z angl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*). Dochází k aktivaci JAK1 a TYK2 (z angl. *tyrosine kinase 2*), které následně fosforylují transkripční faktory STAT1 a STAT2. Ty poté vytváří dimer a dochází k jejich přesunu do jádra, kde se vážou na IRF9 a vzniká ISGF3 (interferonem stimulovaný genový faktor 3) komplex. Komplex se váže na regulační sekvenci ISRE (interferon-stimulated response element), která se nachází ve většině genů indukovaných IFN typu I a spouští expresi stovky genů (tzv. interferonem stimulovaných genů – ISG). Ty dohromady navozují antivirový stav (Ivashkiv & Donlin 2014).

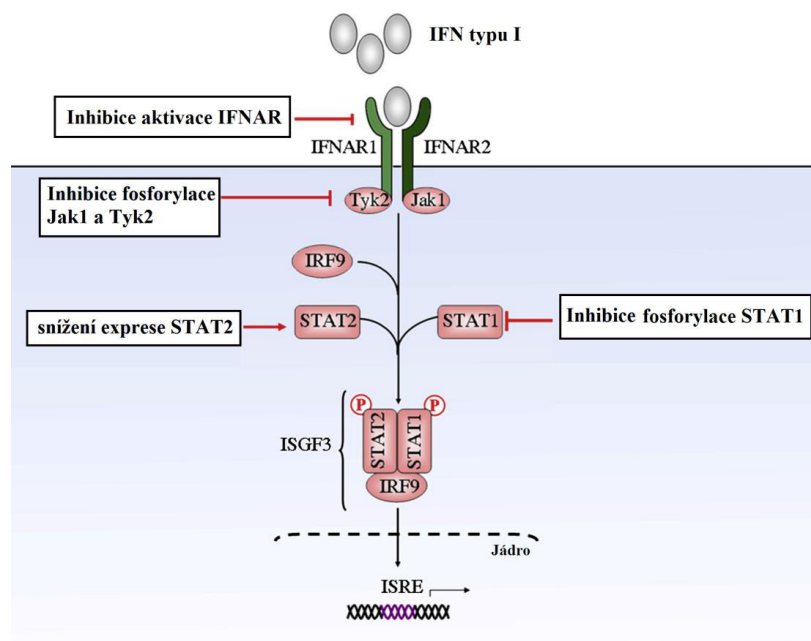
Kromě aktivace STAT1 a STAT2 mohou být fosforylovány i jiné STAT, které rovněž spouštějí dráhu vedoucí k expresi ISG (McNab et al. 2015).

Kromě JAK/STAT signální dráhy dochází po navázání IFN typu I na IFNAR ke spouštění PI3K/Akt dráhy. V této dráze jsou rovněž aktivovány JAK1 a TYK2, které následně fosforylují IRS1 (inzulínový receptorový substrát 1) a IRS2, jež představují vazebné místo pro PI3K (fosfatidylinositol-3 kináza). PI3K poté aktivuje serin-threoninovou kinázu Akt. Akt signální dráha se podílí na řadě funkcí často zahrnujících řízení buněčného dělení, proliferace a přežívání. Tato dráha může rovněž vést k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (Hervas-Stubbs et al. 2011).

U mnoha ISG zatím nebyla uspokojivě vysvětlena jejich úloha, jiné jsou již naopak prostudovány velmi dobře. Mezi dobře charakterizované ISG s antivirotickou aktivitou patří např. proteinkináza R (PKR) či 2'-5' oligoadenylát syntetáza (OAS). PKR je serin-threoninová kináza, která po rozpoznání dsRNA fosforyluje elongační iniciační faktor eIF2 α , což následně vede k blokaci translace buněčné i virové mRNA. OAS je rovněž aktivována virovou dsRNA a vede k aktivaci ribonukleázy L, která katalyzuje štěpení transkriptů virové i hostitelské RNA (García-Sastre & Biron 2006).

Přestože interferony typu I hrají v boji s virovými infekcemi zásadní a nepostradatelnou roli, spousta virů (mezi nimi např. i flaviviry) dokázala vyvinout strategii, pomocí níž jsou do určité míry schopné uniknout imunitní odpovědi zprostředkované IFN typu I.

Nejjednodušší způsob, jak se viry mohou vyhnout imunitním mechanismům, je v první řadě zabránění jejich detekce. Mnoho virů je schopno skrýt či degradovat dsRNA, která vzniká během virové replikace. Např. VKE zpožďuje antivirovou signalizaci tím, že ukrývá RNA molekuly do struktur na ER, kde jsou pro rozpoznání pomocí PRR nedostupné (Miorin et al. 2012). Rovněž bylo prokázáno, že virový strukturální protein NS5 jedná jako interferonový antagonist a je schopný inhibovat interferonem stimulovanou JAK/STAT dráhu takovým způsobem, že blokuje fosforylaci STAT1 a tím brání expresi antivirotických proteinů (Best et al. 2005; Werme et al. 2008).



Obr. 4: Schematické znázornění signální dráhy spouštěné IFN typu I a zvýraznění míst (v rámečcích), ve kterých může vlivem flavivirů docházet k narušení signalizace (převzato z Fernandez-Garcia et al. 2009).

1.5. KLÍŠTĚCÍ SLINY

Klíšťata jsou obligátní krev sající ektoparazitě, kteří parazitují na širokém spektru hostitelů od obojživelníků, přes plazy a ptáky až po savce. Klíšťata jsou rozšířena po celém světě a představují významné přenašeče pro velké množství patogenů. Taxonomicky jsou řazena mezi roztoče (Acari), do řádu Ixodida se 3 čeleděmi: Ixodidae (tzv. tvrdá klíšťata), Argasidae (tzv. měkká klíšťata) a Nuttallielidae (Sonenshine & Roe 2013).

Sání klíšťat na hostiteli je náročný a komplexní proces a to především u klíšťat z čeledi Ixodidae, která pro úspěšně dokončené sání zůstávají na hostiteli pevně přichycena po dobu několika dní. Během sání musí klíště narušit vrstvu epidermis a vytvořit ránu, která se následně naplní krví a vzniká tzv. feeding pool. Pevnému přichycení klíštěte napomáhá tvorba tzv. cementu, který je vylučován slinnými žlázami a upevňuje sací ústrojí v ráně (Sonenshine & Roe 2013).

Poškození kůže vznikající při průniku a fixaci sacího aparátu spouští v místě přísátí silnou hemostatickou, zánětlivou a imunitní odpověď, která by klíštěti za běžné situace dlouhodobé sání zcela znemožnila. Klíšťata si proto musela v průběhu koevoluce se svým hostitelem vyvinout řadu obranných mechanismů, jak se účinně chránit před odmítavou odpovědí ze strany hostitele. Tato ochrana je poskytována prostřednictvím bioaktivních látek obsažených v klíštěcích slinách, které jsou během sání vylučovány do rány a zásadně ovlivňují imunitní mechanismy hostitele ve prospěch sajícího klíštěte (Wikel 2013).

Klíštěcí sliny jsou produkovány ve slinných žlázách nacházejících se v anterolaterální oblasti tělní dutiny klíšťat a jsou složeny z mnoha lalůček (alveolů). Lalůčky jsou navzájem propojeny slinnými vývody, pomocí nichž jsou vznikající sliny odváděny do salivaria. Odtud jsou následně sekretovány do rány v místě přísátí na hostitele (Bowman et al. 2008). Během sání klíštěte dochází k výraznému zvětšování slinných žláz, které mohou navýšit svůj objem až 25×. Rovněž se mění i zastoupení jednotlivých látek ve vylučovaném sekretu. Po odpadnutí klíštěte z hostitele dochází k opětovné degeneraci slinných žláz (Kaufman 1991).

1.5.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HEMOSTÁZU

První obranný mechanismus, který je spuštěn jako reakce na mechanické poškození kůže po přísátí klíštěte, představuje hemostáza. Ta zahrnuje tři základní mechanismy – koagulaci, vazokonstrikci a agregaci krevních destiček. Modulace hemostatických mechanismů hostitele je základním předpokladem pro úspěšné sání klíštěte a umožňují jí látky z klíštěcích slin, které inhibují koagulační kaskádu, mají vazodilatační účinek a

zamezují agregaci krevních destiček. Tato problematika a identifikace konkrétních molekul z klišťecích slin, jež mají vliv na hemostázu, je shrnuta v řadě prací – např. Chmelař et al. 2012; Francischetti 2010; Mans 2010.

1.5.2. VLIV NA IMUNITNÍ ODPOVĚĎ HOSTITELE

Další překážku, se kterou se musí sající klišťe vypořádat, představuje imunitní systém hostitele. Klišťecí sliny popř. extrakt ze slinných žláz (SGE) proto obsahují řadu látek majících vliv jak na přirozenou (nespecifickou), tak i získanou (specifickou) imunitu hostitele.

Mezi časný mechanismus imunitní odpovědi hostitele patří aktivace komplementu. Bylo prokázáno, že sliny z mnoha druhů klišťat jsou schopny inhibovat alternativní dráhu komplementu a rovněž byla v klišťecích slinách identifikována řada konkrétních molekul namířených proti komplementu (Schroeder et al. 2009).

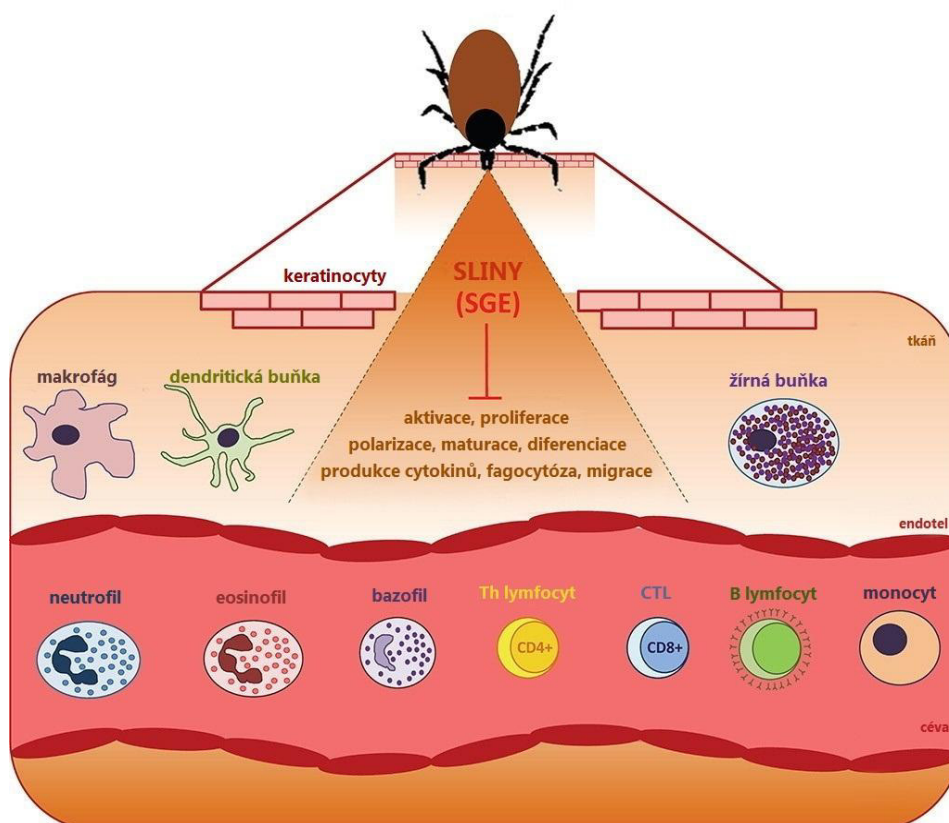
Další reakcí, která je spuštěna velmi krátce po přisátí klišťete, je zánětlivá odpověď vyznačující se především rychlým přesunem leukocytů do místa přisátí. Dochází k aktivaci endoteliálních buněk, keratinocytů, žírných buněk, makrofágů či dendritických buněk. Ve velké míře jsou uvolňovány prozánětlivé chemokiny a cytokiny, jejichž sekrece má za následek přísun neutrofilů a dalších zánětlivých buněk do místa přisátí klišťete (Francischetti et al. 2009).

Doposud byl prokázán modulační účinek klišťecích slin (popř. SGE) na naprostou většinu imunitních buněk účastnících se přirozené imunitní odpovědi, jejíž obraným mechanismům je vystaveno sající klišťe krátce po přisátí. SGE či klišťecí sliny modulují schopnost imunitních buněk fagocytovat či zabíjet patogeny, jak je tomu např. u neutrofilů, dendritických buněk, makrofágů či NK buněk. Mají rovněž vliv na maturaci, proliferaci a migraci buněk, snižují schopnost prezentovat antigen, modulují produkci cytokinů a chemokinů, expresi receptorů či ovlivňují různé signální dráhy vedoucí k expresi genů (shrnuto např. v Kazimírová & Štibrániová 2013).

V průběhu sání klišťete dochází rovněž k aktivaci získané složky imunitní odezvy hostitele a to jak buněčné, tak humorální. V případě opětovného přisátí klišťete dochází k aktivaci paměťových T a B lymfocytů, které se účastní prozánětlivé odpovědi proti přisátému klišťeti uvolňováním specifických cytokinů a produkcí protilátek cílených na klišťecí antigeny ze slinných žláz. Dochází tak k aktivaci komplementu nebo senzitivaci žírných buněk a bazofilů. Ve slinách mnoha druhů klišťat byly nalezeny také látky

potlačující proliferaci T i B lymfocytů a dále látky se schopností měnit skladbu cytokinů produkovaných T lymfocyty (Brossard & Wikel 2004; Wikel 2013).

Této velmi rozsáhlé problematice vlivu klíštěcích slin na jednotlivé složky imunitního systému, popř. konkrétnímu účinku dodnes identifikovaných látek, je věnována celá řada prací (Francischetti et al. 2009; Kazimírová & Štibrániová 2013; Wikel 2013; Kotál et al. 2015). V této práci bude detailnější popis působení klíštěcích slin uveden pouze pro makrofágy.



Obr. 5: Schéma znázorňující vliv klíštěcích slin (SGE) na buňky přirozené i adaptivní imunitní odpovědi (převzato z Kotál et al. 2015).

Vliv klíštěcích slin na makrofágy

Vliv klíštěcích slin či SGE na funkci makrofágů byl prokázán v mnoha případech a to jak jejich účinek na funkci samotných makrofágů, tak jejich vliv na makrofágy v interakci s patogeny. Z toho vyplývá, že makrofágy zřejmě mají zásadní význam při obraně proti sajícímu klíštěti a rovněž v obraně proti přenášeným patogenům.

Bylo pozorováno, že SGE z klíštěte *I. ricinus* potlačuje produkci superoxidu a NO u myších makrofágů stimulovaných spirochetami *Borrelia afzelii* a zároveň snižuje schopnost makrofágů spirochety likvidovat (Kuthejlová et al. 2001). Rovněž bylo zjištěno, že sliny a SGE z téhož klíštěte mají u myších makrofágů inhibiční efekt na fagocytózu spirochet *B. afzelii* a snižují produkci TNF- α (Kýčková & Kopecký 2006).

Sliny z klíštěte *I. scapularis* inhibují u myších makrofágů sekreci prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-12p40, TNF- α a IL-1 β) po stimulaci *Anaplasma phagocytophilum* (Chen et al. 2012).

SGE z klíštěte *Rhipicephalus microplus* modulují po stimulaci pomocí LPS expresi kostimulačních molekul (CD80, CD86, CD40 a CD69) na povrchu makrofágů skotu a rovněž u myší makrofágové linie RAW 264.7. Zároveň dochází k poklesu produkce TNF- α , IFN- γ a IL-12. (Brake et al. 2010; Brake & de León 2012).

SGE z klíštěte *R. appendiculatus* potlačuje u myší makrofágové linie JA-4 transkripci a sekreci IL-1 α , IL-10 a TNF- α . Rovněž inhibuje produkci NO (Gwakisa et al. 2001).

Sliny z klíštěte *Dermacentor variabilis* snižují schopnost myší makrofágové linie IC-21 fagocytovat, ovlivňují migraci buněk a produkci T_H2 cytokinů IL-4 a IL-10 (Kramer et al. 2011).

1.5.3. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA PŘENOS PATOGENŮ

Imunomodulační účinky slin potlačující obranné mechanismy hostitele však nepředstavují výhodu pouze pro sající klíště. Oslabení imunitní odpovědi dává vznik unikátnímu prostředí, které poskytuje vhodné podmínky pro přenos a následné množení patogenů. Takový způsob přenosu je označován jako slinami aktivovaný přenos (SAT) a poprvé byl pozorován u Thogoto viru, kdy bylo popsáno, že přítomnost SGE z klíštěte *R. appendiculatus* výrazně zvýšila počet nakažených nymf, které sály na morčeti, jemuž byl inokulován Thogoto virus (Jones et al. 1989; 1990).

Od popsání SAT efektu u Thogoto viru byl tento způsob přenosu prokázán i u řady dalších patogenů (virů, bakterií i prvoků) a jejich přenašečů a to nejen u klíšťat, ale i u jiných krev sajících členovců. Jmenovat lze např. usnadnění přenosu spirochet *B. burgdorferi* za pomoci klíštěte *I. scapularis* (Zeidner et al. 2002) i *I. ricinus* (Macháčková et al. 2006; Horká et al. 2009) nebo prokázání SAT efektu při přenosu viru klíšťové encefalitidy prostřednictvím SGE z klíštěte *I. ricinus* (Labuda et al. 1993c).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Charakterizovat replikaci VKE v myších makrofázích a ovlivnění replikace VKE klíštěcími slinami.
- 2) Stanovit produkci oxidu dusnatého v těchto buňkách a její ovlivnění klíštěcími slinami.
- 3) Stanovit produkci IFN- β v těchto buňkách a její ovlivnění klíštěcími slinami.
- 4) Otestovat vliv inhibice IFN dráhy na replikaci VKE.
- 5) Otestovat vliv klíštěcích slin na apoptózu virem infikovaných makrofágů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

3.1.1. BUNĚČNÉ LINIE

V pokusech byly používány tři různé myší buněčné linie (PMJ2-R, IC-21 a P388/D1), které byly všechny kultivovány při 37 °C v médiu RPMI 1640 s 10% bovinního fetálního séra (BOFES), 1 % směsi antibiotik (výsl. konc.: penicilin G - 100 j./ml; streptomycin - 100 µg/ml), 1% L-glutaminu (výsl. konc. 292 µg/ml) a 50 mM 2-merkaptoetanolu (vše Biowest).

Linie PMJ2-R pochází z peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6J, které byly *in vivo* infikovány retrovirem J2 nesoucí v-raf a v-myc onkogeny (Adami et al. 1993).

Linie IC-21 vznikla transformací peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6 pomocí viru SV40 (simian virus 40) (Mauel & Defendi 1971).

Linie P388/D1 byla získána z lymfoidního novotvaru indukovaného metylcholantrenem z myši kmene DBA/2 (Dawe & Potter 1957).

Pro stanovení titru viru byly použity liniové PS buňky (odvozené z buněk prasečí ledviny) kultivované při teplotě 37 °C v médiu L₁₅ (Leibowitz) s 3 % prekolostrálního telecího séra (PTS), 1 % směsi antibiotik (výsl. konc.: penicilin G - 100 j./ml; streptomycin - 100 µg/ml) a 1% L-glutaminu (výsl. konc. 292 µg/ml) (vše Biowest).

3.1.2. MYŠI

Pro získání peritoneálních makrofágů a makrofágů z kostní dřevě byly použity samice inbredního myšího kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o.). Myši byly chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

3.1.3. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

K infekci makrofágů byly použity dva různé kmeny západoevropského subtypu VKE – prototypový kmen Neudoerfl a kmen Hypr. Kmen Neudoerfl byl vyizolován v roce 1971 v Rakousku z infikovaného klíštěte *I. ricinus*. Kmen Hypr byl izolován v roce 1953 na Moravě z krve desetiletého pacienta, kterému byla diagnostikována klíšťová encefalitida. Kmen Hypr je v porovnání s kmenem Neudoerfl výrazně neuroinvasivnější a neurovirulentnější.

Oba použité kmeny virů byly získány pomnožením ve Vero buňkách.

3.1.4. KLÍŠTĚCÍ SLINY

Sliny byly získány z dospělých samic klíšťat *I. ricinus*, které byly vlnkovou metodou nachytány ve volné přírodě a poté byly ponechány sát na morčeti po dobu 6-7 dní. Nasátá klíšťata byla pomocí oboustranné lepicí pásky připevněna k podložním sklíčkům a na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena a následně pomocí plastelíny zafixována skleněná kapilára. Na hřbetní část těla byly podle velikosti klíštěte kápnuty 1-2 μ l 5 % roztoku pilokarpinu (Sigma) v 95% etanolu (Penta). Poté byla klíšťata umístěna do vlhké komůrky, kde byla ponechána po dobu 2 hodin při 37 °C. Během této doby docházelo k vylučování slin do kapilár a vyprodukované sliny byly následně sesbírány, sterilizovány filtrací přes filtr (0,22 μ m; Merc Millipore) a uchovány při teplotě -70 °C.

Množství proteinů ve slinách bylo určeno pomocí metody pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda (Bradford 1976).

3.1.5. INHIBITORY

V některých pokusech byly používány inhibitory blokuující dráhu spouštěnou prostřednictvím IFN typu I a to JAK inhibitor I (JAKi) a inhibitor LY294002.

JAK Inhibitor I – specifický inhibitor Janusových kináz (Calbiochem).

LY294002 – specifický inhibitor fosfatidylinositol-3 kinázy (Sigma-Aldrich).

3.2. METODY

3.2.1. REPLIKACE VKE V MAKROFÁZÍCH A JEJÍ OVLIVNĚNÍ KLÍŠTĚCÍMI SLINAMI

Pro tuto sérii pokusů byly použity liniové makrofágy (PMJ2-R, IC-21, P388/D1), peritoneální makrofágy nebo makrofágy získané z kostní dřeně myši. Makrofágy byly infikovány VKE (kmenem Neudoerfl nebo Hypr), se kterým byly inkubovány po dobu 1 hodiny, během níž docházelo k adsorpci virových částic na povrch buněk. Po uplynutí doby inkubace byly nenavázané virové částice odmyty a buňky byly inkubovány v 96-jamkové kultivační destičce.

V případě, že byl sledován vliv klíštěcích slin na replikaci VKE, byly před infekcí buňky nejprve preinkubovány se slinami po dobu 1,5 hodiny.

V časech 2, 24, 48 a 72 hodin po infekci (hpi) byl odebírán supernatant, který byl zamražen a uschován při -70 °C pro následné stanovení titru viru.

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.1.1. Příprava buněk

Buněčné linie (PMJ2-R, IC-21 a P388/D1): Buňky byly uvolněny proudem média (PMJ2-R) nebo seškrabány ze dna kultivační lahve (IC-21 a P388/D1), převedeny do podoby buněčné suspenze a po spočítání v Bürkerově komůrce bylo potřebné množství buněk odebráno do mikrozkmavek, ve kterých byly buňky centrifugovány při 110 g po dobu 5 minut.

Vzniklý pelet byl poté resuspendován v kompletním kultivačním médiu RPMI (tj. RPMI 1640 s 10 % BOFES, antibiotiky, L-glutaminem a 2-merkaptetanolem).

Peritoneální makrofágy (PM): Myš byla usmrcena zlomením vazů a pomocí injekční stříkačky s nasazenou jehlou jí bylo 3 ml vychlazeného základního RPMI (tj. ničím neobohaceného) vypláchnuto peritoneum. Získaná buněčná suspenze byla držena na ledu, aby se zamezilo adhezím makrofágů, a v Bürkerově komůrce byl spočítán počet buněk.

Potřebné množství buněk bylo následně centrifugováno při 200 g, 4 °C po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl resuspendován v kompletním RPMI.

Buňky byly následně nasazeny na 96-jamkovou kultivační destičku (TPP) po 200 μ l na jamku v množství 10^6 buněk/ml (bylo počítáno s tím, že peritoneální makrofágy tvoří 20 % z celkového množství buněk – tj. 2×10^5 buněk/ml). Buňky byly inkubovány v termostatu po dobu 4 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Poté byly neadherované buňky odstraněny 2× opakovaným promytím jamek 150 μ l kompletního média RPMI. Po promytí byl výsledný objem ve všech jamkách 200 μ l.

Makrofágy z kostní dřeni (BMM): Myš byla usmrcena zlomením vazů, zadní končetiny byly zbaveny kůže a odděleny tak, aby stehenní a holenní kost zůstaly neporušené. Kosti byly důkladně očištěny a omyty. Poté byly odstraněny konce kostí a pomocí injekční stříkačky s jehlou byly kosti promyty médiem MEM (Minimum Essential Medium; Sigma) a to takovým způsobem, aby došlo k uvolnění kostní dřeni. Tím byla získána buněčná suspenze, která byla následně přefiltrována přes 70 μ m sítko (Corning FalconTM) do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 8 minut při 250 g a 4 °C.

Vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku 0,84% NH₄Cl (Lachema) za účelem lýzování erytrocytů. Po 2 minutách působení lyzačního roztoku bylo přidáno 10 ml MEM a buňky byly centrifugovány po dobu 8 minut při 250 g a 4 °C.

Vzniklý pelet byl resuspendován v kompletním kultivačním médiu RPMI. Buňky byly následně spočítány a v množství 3×10^6 buněk/10 ml kompletního RPMI s přidaným

GM-CSF (výsl. konc. 20 ng/ml) byly nasazeny na bakteriální kultivační misky (po 10 ml na misku).

Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 8 dnů, přičemž 3. den bylo buňkám přidáno 10 ml čerstvého kultivačního média RPMI s GM-CSF a 6. den bylo buňkám 10 ml média odebráno a opět přidáno 10 ml čerstvého kultivačního média RPMI s GM-CSF. Osmý den bylo odstraněno médium s neadherovanými buňkami a adherované buňky (makrofágy) byly ze dna misky seškrabány, spočítány, naředěny v potřebném množství kultivačního média RPMI a nasazeny na 96-jamkovou kultivační destičku po 200 µl na jamku v množství 2×10^5 buněk/ml.

Poté byly inkubovány v termostatu po dobu 3 hodin při 37 °C a 5 % CO₂, aby došlo k jejich adhezenci na dna jamek.

3.2.1.2. Infekce buněk

K připraveným buňkám byl buď do mikrozkuvek (v případě buněčných linií), nebo do jednotlivých jamek kultivační destičky (v případě PM a BMM) přidán virus (kmen Neudoerfl nebo Hypr) v množství MOI = 4 (tj. v množství 4 virové částice na buňku).

Buňky byly spolu s virem inkubovány po dobu 1 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂.

V případě sledování vlivu klíčecích slin předcházel infekci virem preinkubace buněk s klíčecími slinami (výsl. konc. 10 µg/ml) po dobu 1,5 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂. Skupiny, k nimž nebyly přidávány sliny, byly doplněny odpovídajícím množstvím kultivačního média.

Po uplynutí inkubační doby byly buňky promyty od volných, nenávaných virových částic. Mikrozkuvky s buněčnými liniemi byly 2× promyty centrifugací (5 minut, 100 g, 4 °C). Promyté buňky byly resuspendovány v potřebném množství kultivačního média a následně byly nasazeny na 96-jamkovou kultivační destičku (200 µl/jamku) v množství 2×10^5 buněk/ml.

PM a BMM byly zbaveny volných virových částic odsáním 150 µl média z jamek a přidáním 150 µl nového kultivačního média. Tento postup byl následně 2× opakován s tím, že výsledný objem po promytí byl ve všech jamkách 200 µl.

Ke skupinám, které byly před infekcí preinkubovány s klíčecími slinami, byly sliny znovu přidány (výsl. konc. 10 µg/ml). Skupiny, k nimž nebyly přidávány sliny, byly doplněny odpovídajícím množstvím kultivačního média.

Kultivační destičky s buňkami byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ a v časech 2, 24, 48 a 72 hpi byly z příslušných jamek odebírány vzorky supernatantu (150 µl), které byly zamrazeny a uskladněny při -70 °C pro následné stanovení titru viru.

3.2.1.3. Plaková titrace

Pro stanovení množství virových částic v odebraných vzorcích byla použita metoda plakové titrace.

PS buňky byly za pomoci verzentrypsinu uvolněny ze dna kultivační lahve, rozsuspendovány v kompletním médiu L₁₅ (tj. L₁₅ s 3 % PTS, antibiotiky a L-glutaminem) a následně spočítány v Bürkerově komůrce. Po odebrání potřebného množství buněk byly buňky doplněny médiem do požadovaného objemu a umístěny do lednice, aby se zamezilo jejich adhezenci.

Do 24-jamkových panelů (TPP) bylo přidáno po 180 µl média L₁₅ na jamku, do kterého byly pipetovány a následně desítkovou řadou naředěny jednotlivé vzorky (20 µl) odebrané v předchozím bodu. K takto naředěným vzorkům bylo následně do každé jamky přidáno 300 µl suspenze PS buněk (v množství 3 × 10⁵ buněk/ml).

Panely byly inkubovány v termostatu 4 hodiny při 37 °C a 0,5 % CO₂. Poté byl obsah jamek převrstven 400 µl roztoku 2× koncentrovaného L₁₅ média a 3% roztoku karboxymethylcelulózy (Sigma) v poměru 1 : 1. Panely byly inkubovány při 37 °C a 0,5 % CO₂ po dobu 5 dní.

Po uplynutí inkubační doby došlo ke vzniku plaků, které byly zviditelněny barvením. Nejprve byly panely promyty v 0,9% roztoku NaCl (Lach-Ner) a poté byly po dobu 45 minut barveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody). Následně byly omyty pod tekoucí vodou a bylo spočítáno množství vzniklých plaků, které byly viditelné jako neobarvená ložiska virem zlyzovaných buněk mezi ostatními obarvenými buňkami.

3.2.2. ZASTOUPENÍ INFIKOVANÝCH BUNĚK U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN MAKROFÁGŮ

Příprava i infekce buněk v této sérii pokusů byla prováděna stejným způsobem jako ve výše uvedené postupu (viz bod 3.2.1.1. a 3.2.1.2.).

Buňky však byly namísto kultivace v 96-jamkové destičce kultivovány na sklíčku, na kterém bylo připevněno 16 odstranitelných jamek. Tento systém umožňoval kultivaci buněk přímo na mikroskopickém sklíčku a následné použití na mikroskopii. U buněčných linií se

rovněž lišila používaná koncentrace buněk, neboť bylo z důvodu snazšího prohlížení preparátu zvoleno menší množství a to 5×10^4 buněk/ml. Koncentrace PM a BMM zůstala neupravena.

Po infekci VKE (byl používán pouze kmen Hypr, MOI = 4) a následném promytí od volných virových částic byly buňky inkubovány 48 hodin a poté byly fixovány a imunofluorescenčně značeny. Značení bylo prováděno přidáním primární protilátky proti flavivirovému proteinu E a fluorescenčně značené sekundární protilátky. Preparáty byly prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem.

V případě, že byl sledován vliv klišťecích slin, byly před infekcí buňky nejprve preinkubovány se slinami (výsl. konc. 10 µg/ml) po dobu 1,5 hodiny.

Všechny pokusy byly prováděny v triplikacích.

3.2.2.1. Imunofluorescenční značení

Buňky infikované kmenem Hypr byly inkubovány ve vlhké komůrce po dobu 48 hodin při 37 °C a 5 % CO₂ a poté byly fixovány ponořením celého sklíčka s jamkami (Thermo Scientific Nunc) do roztoku acetonu (Penta) a methanolu (Penta) v poměru 1 : 1, který byl vychlazen na -20 °C. Fixace probíhala 10 minut.

Poté byly odstraněny plastové jamky a na sklíčku zůstaly pouze silikonové kroužky, které tvořily dolní okraje odstraněných jamek. Po oschnutí sklíčka bylo do každého kroužku (zbytku po jamce) přidáno 40 µl PBS s 10 % BOFES na dobu 30 minut, čímž bylo zabráněno nespecifické vazbě protilátek.

V množství 40 µl na „jamku“ byla přidána myší protilátka proti povrchovému E proteinu flavivirů (Sigma-Aldrich) naředěná s roztokem PBS-T (PBS s 0,05 % Tween-20; Sigma-Aldrich) v poměru 1 : 250. Následovala inkubace ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Po uplynutí inkubace bylo sklíčko 3×promyto v PBS-T po dobu 1 minuty.

Poté byla ve stejném množství jako primární protilátka přidána sekundární anti-myší protilátka konjugovaná s FITC (fluorescein-5-isothiokyanát; Sigma-Aldrich) naředěná s PBS-T v poměru 1 : 500 a opět následovala inkubace ve vlhké komůrce po dobu 1 hodiny při 37 °C.

Po uplynutí inkubace bylo sklíčko promyto v PBS-T a následně bylo do každé „jamky“ přidáno 40 µl DAPI (Sigma-Aldrich) naředěného deionizovanou vodou v poměru 1 : 1000. Následovala inkubace při 37 °C ve vlhké komůrce po dobu 10 minut.

Po uplynutí inkubace bylo sklíčko 3× promyto v PBS-T a byly odstraněny silikonové kroužky.

Po oschnutí byl na sklíčko nakapán 2,5% roztok 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO; Sigma-Aldrich), preparát byl překryt krycím sklíčkem a byl prohlížen pod mikroskopem Olympus BX53 vybaveným CCD kamerou (Olympus DP-73), pomocí níž byla pořízena fotodokumentace (viz Příloha 1 a 2).

3.2.3. PRODUKCE OXIDU DUSNATÉHO V INFIKOVANÝCH MAKROFÁZÍCH

Na stanovení produkce NO byly použity buněčné linie (IC-21 a PMJ2-R) a PM. Buňky byly připraveny a infikovány stejným způsobem jako ve výše uvedené postupu při přípravě a infekci buněk pro stanovení titru viru (viz bod 3.2.1.1. a 3.2.1.2.).

Kromě skupiny buněk infikovaných VKE (kmenem Neudoerfl nebo Hypr) byly navíc zahrnuty dvě kontrolní skupiny neinfikovaných buněk, ke kterým bylo namísto viru přidáno odpovídající množství média L₁₅, v němž byly kultivovány Vero buňky, v nichž byl použit virus pomnožen. První kontrolní skupina zahrnovala pouze neinfikované buňky (negativní kontrola), druhá skupina (pozitivní kontrola) obsahovala neinfikované buňky stimulované přidáním LPS (výsl. konc. 100 ng/ml) a IFN- γ (výsl. konc. 5 ng/ml pro buněčnou linii IC-21 a 10 ng/ml pro PMJ2-R a PM).

Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ a pro jednotlivé časové intervaly (24, 48 a 72 hpi) byla příslušná kultivační destička umístěna do -70 °C pro následné stanovení produkce NO.

Produkce NO byla stanovována z rozmraženého obsahu jamek pomocí Griessova testu založeného na detekci dusitanů (NO₂⁻), kdy po přidání Griessova reagens dojde v přítomnosti NO₂⁻ ke změně zbarvení substrátu a tato změna je následně detekována na spektrometru.

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.3.1. Griessův test

Naředěním roztoku 0,1 mM NaNO₂ (Penta) do 96-jamkové kultivační destičky s plochým dnem byla sestavena kalibrační přímka.

Poté bylo do jednotlivých jamek na panel přeneseno 100 μ l vzorků, ke kterým bylo přidáno 100 μ l Griess reagens (Sigma).

Panel se vzorky byl ponechán 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté, co došlo ke změně zabarvení, byla měřena absorbance při 540 nm na spektrometru (Synergy H1 microplate reader; BioTek).

3.2.4. PRODUKCE IFN- β V INFIKOVANÝCH MAKROFÁZÍCH A JEJÍ OVLIVNĚNÍ KLÍŠTĚCÍMI SLINAMI

Produkce IFN- β byla stanovována ze supernatantů infikovaných buněk odebíraných v časech 2, 24, 48 a 72 hpi. Buňky byly připraveny a infikovány stejným způsobem jako ve výše uvedeném postupu při přípravě a infekci buněk pro stanovování titru viru (viz bod 3.2.1.1. a 3.2.1.2.).

Kromě skupiny buněk infikovaných VKE (opět kmenem Neudoerfl nebo Hypr, MOI = 4), byla navíc zahrnuta kontrolní skupina neinfikovaných buněk sloužící jako negativní kontrola.

V případě, že byl sledován vliv klíštěcích slin, byly před infekcí buňky nejprve preinkubovány se slinami (výsl. konc. 10 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 1,5 hodiny.

Množství IFN- β ve vzorcích bylo stanovováno sendvičovou metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.4.1. Stanovení IFN- β

Množství IFN- β ve vzorcích bylo stanovováno pomocí kitu LEGEND MAX™ Mouse IFN- β ELISA Kit (BioLegend, Inc.). Postup byl prováděn přesně podle návodu výrobce.

Absorbance byla měřena na spektrometru při 450 nm.

3.2.5. VLIV INHIBITORŮ JAKi a LY294002 NA REPLIKACI VKE A PRODUKCI IFN- β V INFIKOVANÝCH MAKROFÁZÍCH

Pro tento pokus byly použity pouze buněčné linie PMJ2-R a IC-21, které byly připraveny a infikovány stejným způsobem jako ve výše uvedené postupu při přípravě a infekci buněk pro stanovování titru viru (viz bod 3.2.1.1. a 3.2.1.2.).

K infekci byl použit pouze kmen Hypr v infekční dávce MOI = 1. V tomto pokusu byly použity inhibitory JAKi (inhibitor JAK) a LY294002 (inhibitor PI3K), které byly přidány k infikovaným buňkám rozděleným na čtyři skupiny:

- I. infikované buňky (Hypr, MOI = 1)
- II. infikované buňky + JAKi (výsl. konc. 1 μ M) (preinkubace 30 minut před infekcí)
- III. infikované buňky + LY294002 (výsl.konc. 10 μ M) (preinkubace 30 minut před infekcí)
- IV. infikované buňky + LY294002 (výsl. konc. 10 μ M) (bez preinkubace)

Kultivační destičky s buňkami byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ a v časech 24 a 48 hpi byly z příslušných jamek odebírány vzorky supernatantu (150 μ l), které byly zamraženy a uskladněny při -70 °C pro následné stanovení titru viru (viz bod 3.2.1.3.) a produkce IFN- β (viz bod 3.2.4.1.).

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.6. PŘEŽÍVÁNÍ A APOPTÓZA INFIKOVANÝCH MAKROFÁGŮ OVLIVNĚNÝCH KLÍŠTĚCÍMI SLINAMI

Buňky byly připraveny a infikovány stejným způsobem jako při přípravě a infekci buněk pro stanovení titru viru (viz bod 3.2.1.1. a 3.2.1.2.).

Na rozdíl od předcházející série pokusů byla použita pouze buněčná linie PMJ2-R a k infekci byl použit jen kmen Hypr (MOI = 4).

Kromě skupin obsahujících infikované buňky a infikované buňky s přidávanými klíštěcími slinami (výsl. konc. 10 μ g/ml) byla navíc zahrnuta skupina neinfikovaných buněk (kontrolní skupina) a skupina neinfikovaných buněk s přidávanými slinami (výsl. konc. 10 μ g/ml).

Kultivační destičky s buňkami byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂. V časových intervalech 24, 48 a 72 hpi bylo stanovováno přežívání buněk a byla měřena aktivita kaspázy-3 (proapoptická signalizace) a serin-threoninové kinázy Akt (antiapoptická signalizace) na průtokovém cytometru.

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích.

3.2.6.1. Přežívání buněk

Ke sledování přežívání buněk byl použit roztok alamarBlue® Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Tento roztok obsahuje modré, slabě fluorescenční barvivo resazurin, které je v metabolicky aktivních buňkách redukováno na

růžový, silně fluorescenční resorufin. Resorufin lze poté detekovat pomocí absorbance či fluorescence a následně tak stanovit životaschopnost buněk.

K příslušným skupinám buněk bylo v jednotlivých časových intervalech přidáno 20 μ l roztoku alamarBlue® a buňky byly inkubovány v termostatu 4 hodiny při 37 °C a 5 % CO₂.

Po uplynutí doby inkubace byla na spektrometru stanovena u jednotlivých skupin buněk fluorescence (excitační vlnová délka: 550 nm, emisní vlnová délka: 590 nm).

3.2.6.2. Stanovení aktivity kaspázy-3 a Akt

Množství aktivní kaspázy-3 v buňkách bylo stanoveno pomocí kitu FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™).

Buňky byly nejprve v jednotlivých časových intervalech přeneseny z kultivační destičky do mikrozkuvek. Následně bylo postupováno přesně dle instrukcí výrobce, kdy byly buňky promyty, fixovány a značeny protilátkou rozeznávající aktivní kaspázu-3. V bodě, ve kterém byla ke vzorkům přidávána FITC značená protilátka proti aktivní kaspáze-3, byla ke vzorkům navíc přidána 20 \times ředěná APC (allofykocyanin) značená protilátka proti aktivní formě Akt (Miltenyi Biotec, Inc.).

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ II s použitím softwaru BD FACSDiva™ Software v. 6.1.3.

3.2.7. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu R (R Development Core Team 2008) metodou jednocestné analýzy variance (ANOVA). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro $p < 0,05$, dvě pro $p < 0,01$, tři hvězdičky pro $p < 0,001$).

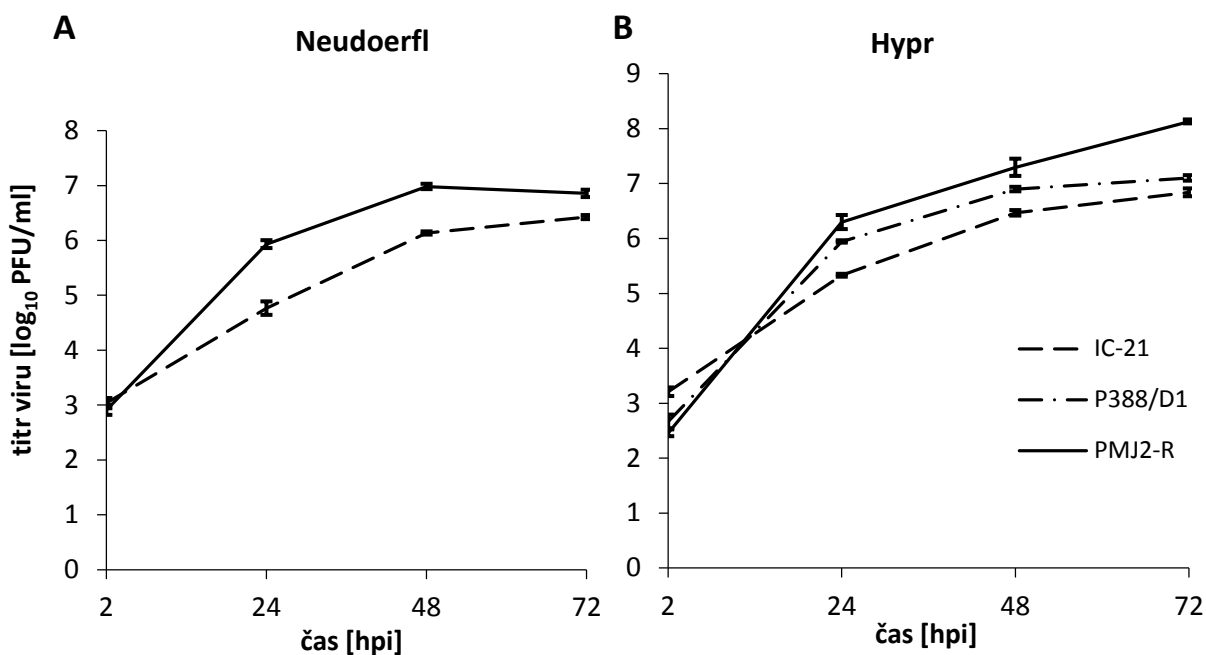
Všechny grafy ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry ze stanovených hodnot a chybové úsečky v grafech představují střední chybu průměru (SEM).

4. VÝSLEDKY

4.1 REPLIKACE VKE V MAKROFÁZÍCH A JEJÍ OVLIVNĚNÍ SLINAMI

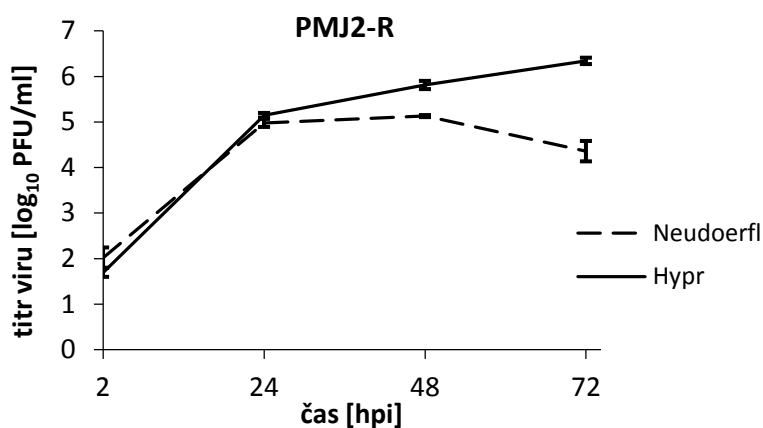
Cílem této série pokusů bylo charakterizovat replikaci dvou odlišných kmenů VKE (tj. kmene Neudoerfl a Hypr) v různých myších makrofázích a to jak v buněčných liniích (PMJ2-R, IC-21 a P388/D1), tak i v peritoneálních makrofázích (PM) a makrofázích derivovaných z kostní dřeně (BMM). Replikace VKE byla sledována v časech 2, 24, 48 a 72 hpi.

Při sledování replikace VKE v buněčných liniích se virus nejméně množil v linii IC-21 a naopak nejvyšší replikace bylo dosaženo v linii PMJ2-R a to jak v případě infekce kmenem Neudoerfl (obr. 6A), tak v případě infekce kmenem Hypr (obr. 6B). U linie P388/D1 se po infekci kmenem Hypr pohyboval titer viru mezi dvěma zmíněnými liniemi.



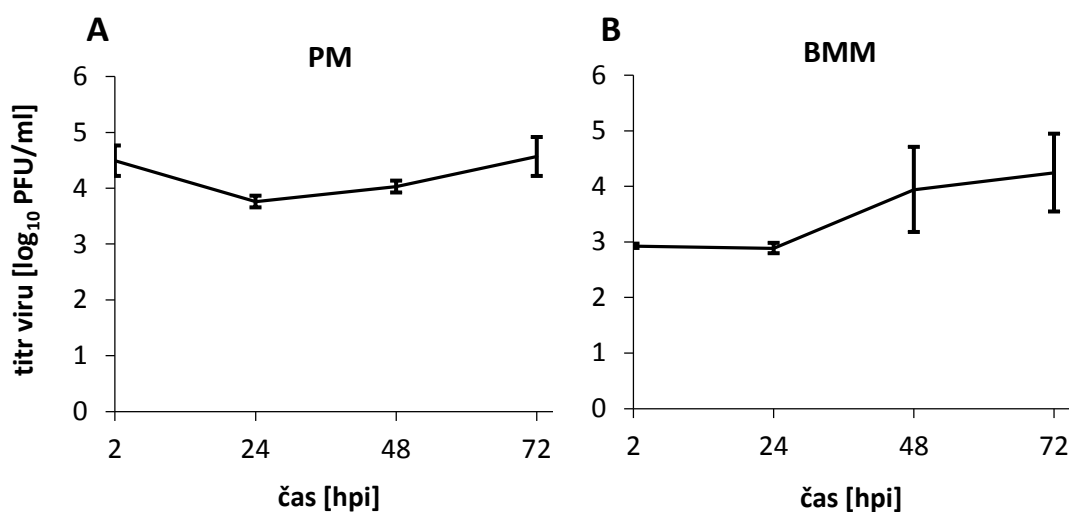
Obr. 6: Replikace VKE v buněčných liniích IC-21, P388/D1 a PMJ2-R v časových intervalech 2, 24, 48 a 72 hpi při použití dvou různých kmenů viru – kmene Neudoerfl (A) a Hypr (B), oba v počáteční infekční dávce MOI = 4.

Při porovnání replikace kmene Neudoerfl a kmene Hypr v linii PMJ2-R je patrné, že infekce virulentnějším kmenem Hypr vyvolala v čase 24 hpi mírně vyšší titr viru v porovnání s kmenem Neudoerfl. Tento trend s postupem času (48 a 72 hpi) narůstal a rozdíly v titrech obou kmenů virů se staly výraznějšími (obr. 7).



Obr. 7: Replikace virového kmene Neudoerfl a kmene Hypr (MOI = 4) v buněčné linii PMJ2-R v časových intervalech 2, 24, 48 a 72 hpi.

Kromě replikace VKE v buněčných liniích bylo množení viru (kmen Hypr) sledováno rovněž v PM a BMM. Na rozdíl od replikace viru Hypr v buněčných liniích nedocházelo u PM ani u BMM k tak výraznému nárůstu titru viru v závislosti na čase a u obou se množství viru v odebraném supernatantu v průběhu času jen mírně zvyšovalo (obr. 8A a 8B).

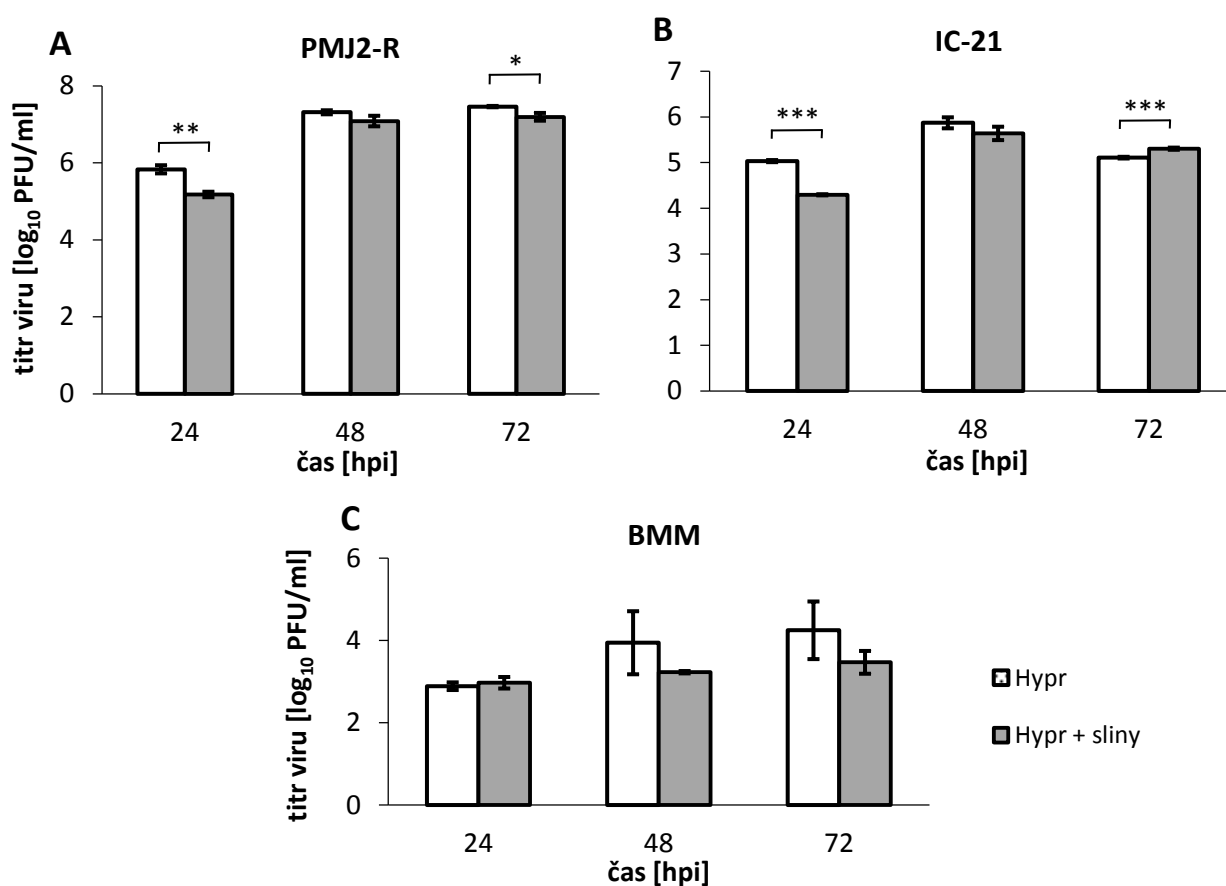


Obr. 8: Replikace kmene Hypr (MOI = 4) v PM (A) a v BMM (B) v časových intervalech 2, 24, 48 a 72 hpi.

Poté, co bylo charakterizováno množení VKE u jednotlivých skupin makrofágů, byl testován vliv klíštěcích slin na tuto replikaci. Vliv klíštěcích slin byl sledován během replikace virového kmene Hypr v buněčných liniích PMJ2-R a IC-21 a rovněž u makrofágů derivovaných z kostní dřevě v časových intervalech 24, 48 a 72 hpi (obr. 9).

U obou linií došlo v čase 24 hpi vlivem klíštěcích slin k signifikantnímu snížení titru viru a to o 11 % u linie PMJ2-R a o 15 % u IC-21 (obr. 9A a 9B). Stejný trend byl pozorován i 48 hpi, kdy však bylo snížení daleko nižší a statisticky nevýznamné. Po 72 hpi bylo působení slin na titer viru u jednotlivých linií odlišné – u PMJ2-R došlo u skupiny s přidanými slinami k signifikantnímu poklesu titru viru (o 4 %), zatímco u linie IC-21 došlo k statisticky významnému zvýšení titru (o 4 %). Stejný pokus byl minimálně 3× zopakován s podobným výsledkem. V čase 24 hpi došlo vždy vlivem slin k statisticky významnému poklesu titru viru. V čase 48 hpi došlo rovněž k signifikantnímu nebo alespoň trendovému poklesu. V čase 72 hpi byly naopak výsledky nejednotné, neboť došlo vlivem slin buď k signifikantnímu snížení, nebo naopak k statisticky významnému zvýšení titru viru.

U BMM byl v časech 48 a 72 hpi pozorován vlivem slin trendový pokles titru viru, který však nebyl z důvodu velkých odchylek signifikantní (obr. 9C).



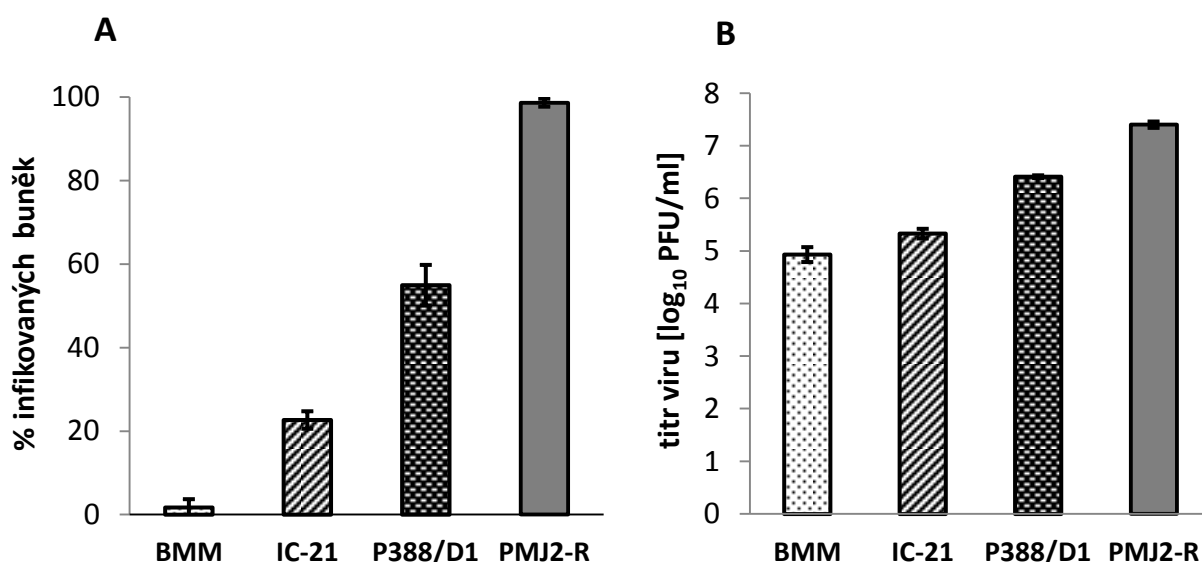
Obr. 9: Vliv klíštěcích slin (10 µg/ml) na replikaci kmene Hypr (MOI = 4) v liniích PMJ2-R (A) a IC-21 (B) a BMM (C) v časech 24, 48 a 72 hpi.

4.2. ZASTOUPENÍ INFIKOVANÝCH BUNĚK U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN MAKROFÁGŮ

Po provedení předchozích pokusů bylo pozorováno, že replikace VKE v myších makrofázích se mezi jednotlivými skupinami použitých makrofágů liší. V návaznosti na to byly provedeny pokusy, jejichž cílem bylo zjistit, zda se kromě odlišné míry replikace liší jednotlivé skupiny makrofágů i zastoupením infikovaných buněk a zda může být toto zastoupení nějakým způsobem ovlivněno působením klíštěcích slin.

S využitím imunofluorescenčního značení virových částic bylo zjištěno, že při infekci virem Hypr se 48 hpi množství infikovaných a neinfikovaných buněk mezi jednotlivými skupinami makrofágů značně lišilo (obr. 10A; ukázka fotodokumentace viz Příloha 1). Nejvyšší zastoupení infikovaných buněk bylo pozorováno u linie PMJ2-R (98,7 %), naopak nejnižší bylo stanoveno u BMM (1,7 %). U linie IC-21 byla infikována necelá čtvrtina buněk (22,7 %) a u P388/D1 více než polovina (55,0 %).

Procento infikovaných buněk u jednotlivých skupin makrofágů korespondovalo s titrem viru (obr. 10B), který byl stanoven z odebraných supernatantů metodou plakové titrace. Nejméně se virus replikoval v BMM a se zvyšujícím se procentuálním zastoupením infikovaných buněk docházelo ke zvýšení titru viru, který dosahoval nejvyšší hodnoty u linie PMJ2-R.

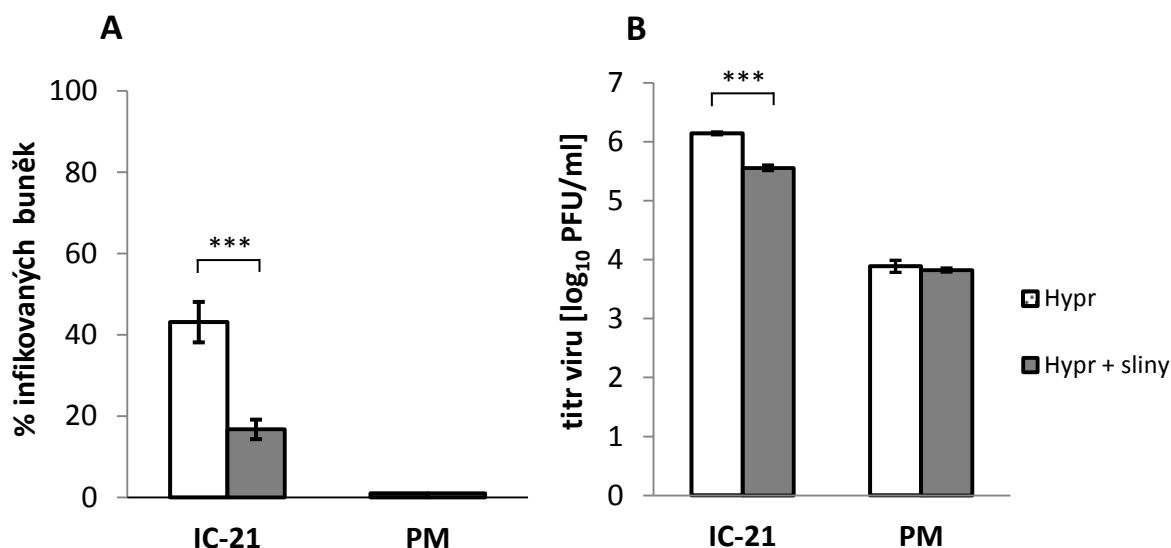


Obr. 10: Procentuální zastoupení buněk infikovaných kmenem Hypr (MOI = 4) stanovené 48 hpi u jednotlivých skupin makrofágů – BMM, IC-21, P388/D1 a PMJ2-R (A) a tomu odpovídající replikace viru (B).

Poté, co bylo stanoveno zastoupení infikovaných buněk u jednotlivých skupin makrofágů, bylo testováno, zda může být toto zastoupení ovlivněno přidáním klíštěcích slin.

Vlivem klíštěcích slin došlo u linie IC-21 infikované kmenem Hypr v čase 48 hpi k signifikantnímu snížení procenta infikovaných buněk a to ze 43,1 % na 16,7 % (obr. 11A). Vliv klíštěcích slin byl sledován i u peritoneálních makrofágů, u kterých bylo však procento infikovaných buněk velmi nízké (< 1 %) a vliv klíštěcích slin proto nemohl být věrohodně posouzen.

Procento infikovaných buněk u linie IC-21 rovněž odpovídalo replikaci viru, kdy bylo pozorováno, že ve skupině s přidávanými slinami došlo ke statisticky významnému poklesu titru viru a to o 10 % (obr. 11B). U PM nebyl patrný žádný vliv klíštěcích slin.



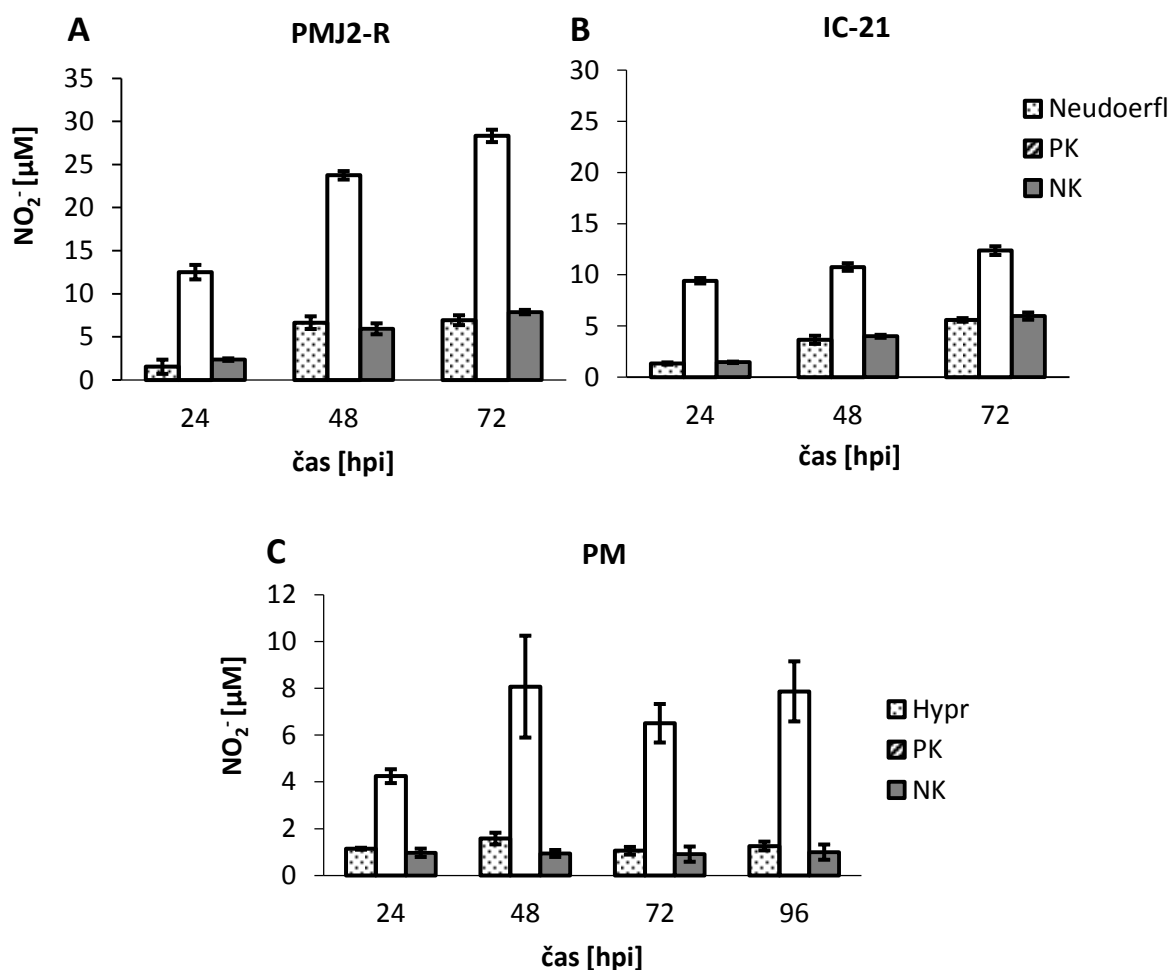
Obr. 11: Vliv klíštěcích slin (10 µg/ml) na procentuální zastoupení infikovaných buněk (kmenem Hypr, MOI = 4) u linie IC-21 a u PM v čase 48 hpi (A) a tomu odpovídající replikace viru (B).

4.3. PRODUKCE OXIDU DUSNATÉHO V INFIKOVANÝCH MAKROFÁZÍCH

Tato série pokusů byla provedena za účelem zjištění, zda a do jaké míry dochází k produkci oxidu dusnatého (NO) v myších makrofázích po jejich infekci VKE.

V pokusech byla používána jako pozitivní kontrola (PK) skupina neinfikovaných makrofágů stimulovaných přidáním LPS (výsl. konc. 100 ng/ml) a IFN- γ (výsl. konc. 5 ng/ml pro IC-21 a 10 ng/ml pro PMJ2-R a PM). Negativní kontrolu (NK) představovaly neinfikované a nestimulované makrofágy.

U buněčných linií infikovaných virem Neudoerfl (MOI = 4) nebylo v časových intervalech 24, 48 a 72 hpi pozorováno žádné zvýšení produkce NO v porovnání s negativní kontrolou (obr. 12A a 12B). Stejných výsledků bylo dosaženo i při infekci těchto linií virulentnějším kmenem Hypr. U PM rovněž nebylo vlivem infekce VKE zaznamenáno navýšení produkce NO a to i přesto, že byl používán kmen Hypr ve vyšší infekční dávce (MOI = 10) a obsah NO₂⁻ ve vzorcích byl stanovován i v čase 96 hpi (obr. 12C).



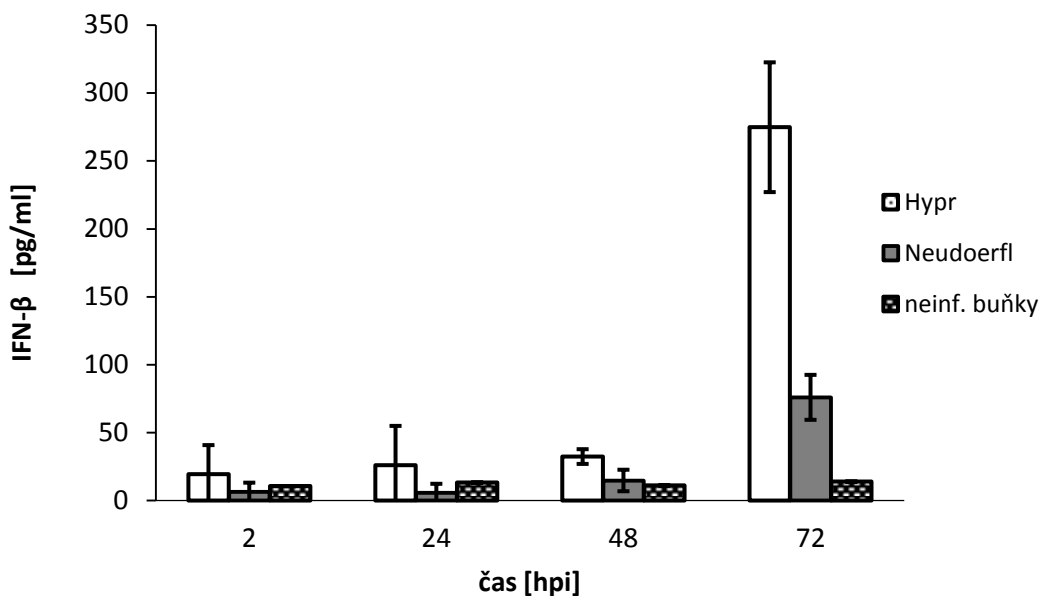
Obr. 12: Stanovení množství NO₂⁻ u linií infikovaných kmenem Neudoerfl (MOI = 4) v časech 24, 48 a 72 hpi (A, B) a u PM infikovaných kmenem Hypr (MOI = 10) po 24, 48, 72 a 96 hpi (C).

4.4. PRODUKCE IFN- β V INFIKOVANÝCH MAKROFÁZÍCH A JEJÍ OVLIVNĚNÍ KLÍŠTĚCÍMI SLINAMI

Tato série pokusů byla zaměřena na zjištění, zda dochází pod vlivem infekce VKE v myších makrofázích k produkci IFN- β a zda je tuto produkci možné ovlivnit přidáním klíštěcích slin.

Nejprve byla sledována produkce IFN- β u buněčné linie PMJ2-R a to při infekci oběma kmeny VKE - kmenem Hypr a Neudoerfl (MOI = 4) v časech 2, 24, 48 a 72 hpi. Pokus rovněž zahrnoval skupinu neinfikovaných buněk.

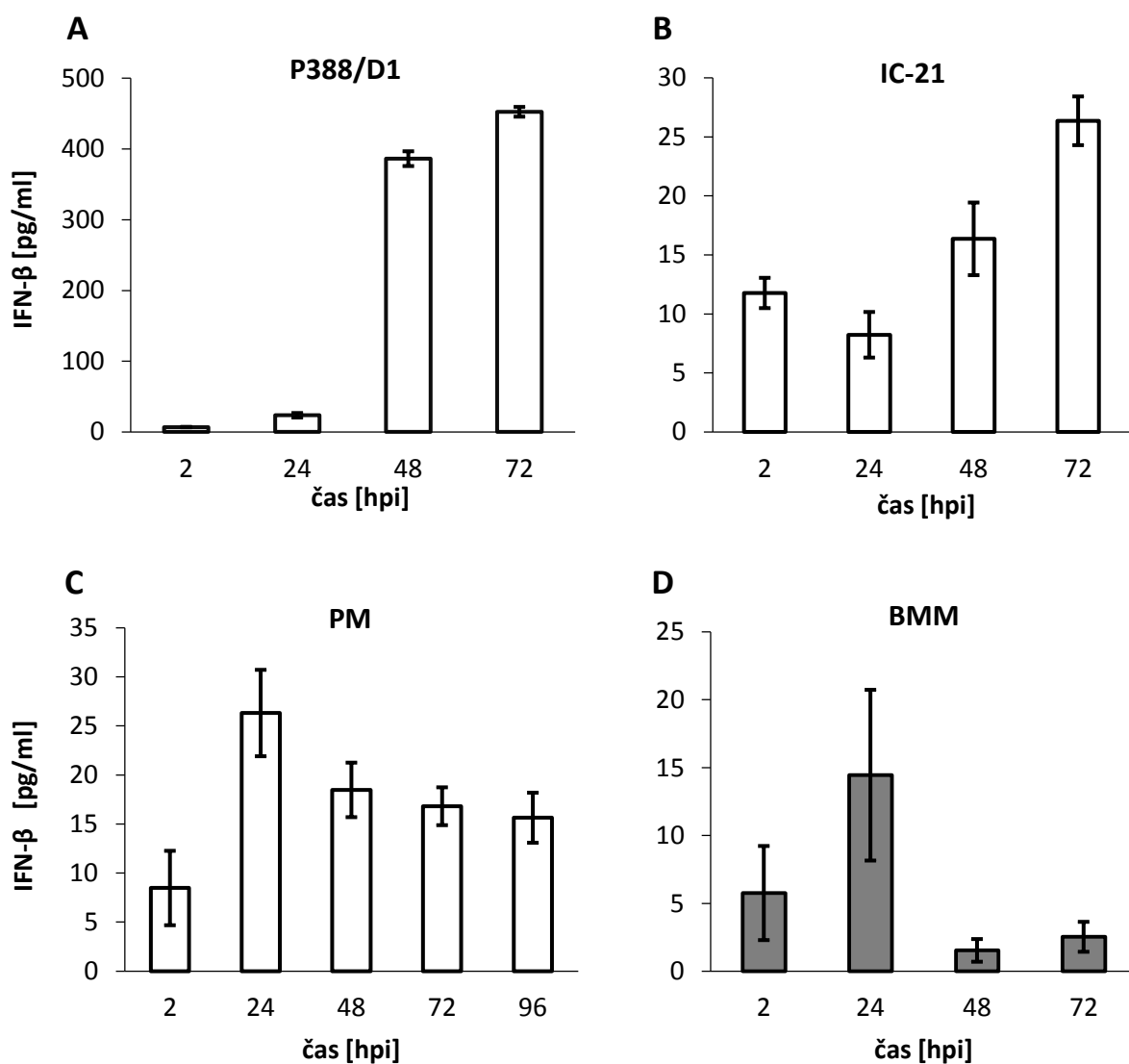
V časech 2 a 24 hpi bylo stanovené množství IFN- β u obou infikovaných skupin buněk velmi nízké a nelišilo se (nebo jen velmi málo) od neinfikovaných buněk (obr. 13). V případě infekce virem Neudoerfl nedošlo k vzestupu produkce IFN- β ani v čase 48 hpi a výraznější nárůst vyprodukovaného IFN- β byl patrný až po 72 hodinách od infekce. U skupiny infikované kmenem Hypr bylo zaznamenáno zvýšení produkce IFN- β již v čase 48 hpi a v čase 72 hpi došlo k velmi výraznému vzestupu v množství vyprodukovaného IFN- β , které bylo značně vyšší než v případě skupiny infikované kmenem Neudoerfl.



Obr. 13: Množství IFN- β vyprodukovaného buňkami linie PMJ2-R při infekci kmenem Hypr a Neudoerfl (MOI = 4) v časových intervalech 2, 24, 48 a 72 hpi.

Při sledování produkce IFN- β u ostatních makrofágů byl používán pouze kmen Hypr, který u linie PMJ2-R vyvolal vyšší produkci IFN- β .

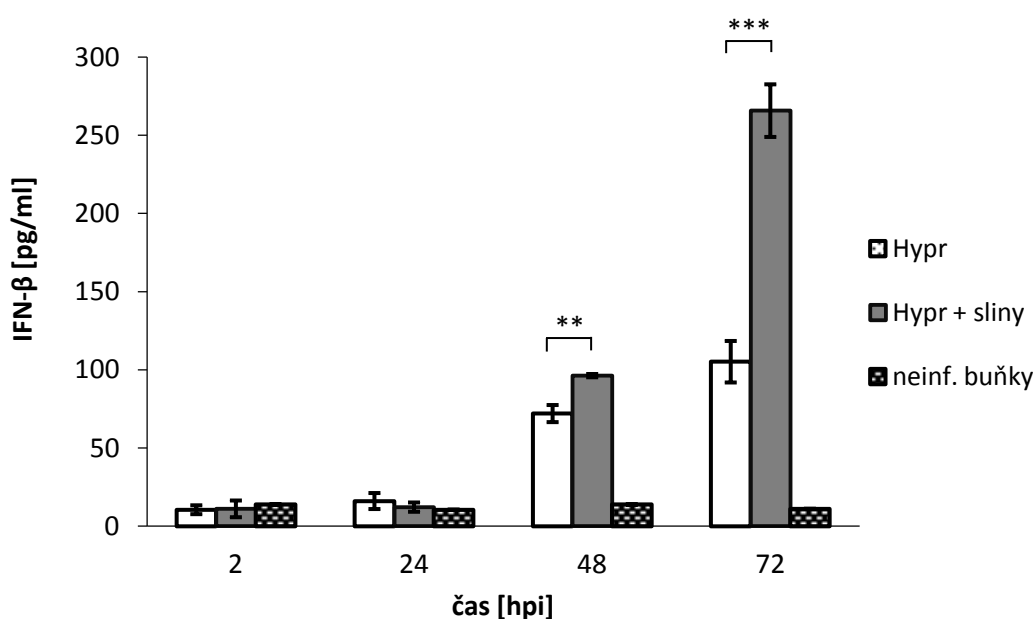
U buněčné linie P388/D1 byl pozorován shodný vzestupný trend v množství vyprodukovaného IFN- β jako u buněčné linie PMJ2-R s tím rozdílem, že k výraznému vzestupu došlo již v čase 48 hpi (obr. 14A). Naopak u buněčné linie IC-21 byl sice v časech 24 až 72 hpi rovněž pozorován vzestupný trend, naměřené množství však bylo velmi nízké a k žádnému výraznému nárůstu nedošlo (obr. 14B). V případě PM a BMM byly hodnoty naměřeného IFN- β rovněž velmi nízké s maximem v čase 24 hpi (obr. 14C a 14D), přičemž u PM byla použita vyšší infekční dávka (MOI = 10) a produkce IFN- β byla pozorována i v čase 96 hpi.



Obr. 14: Množství IFN- β vyprodukovaného v linii P388/D1 (A), v linii IC-21 (B), v PM (C) a BMM (D) po infekci kmenem Hypr.

Vliv klíštěcích slin na produkci IFN- β byl sledován u buněčné linie PMJ2-R (obr. 15). V časech 2 a 24 hpi nebyl pozorován žádný nárůst v produkci a ke zvýšení množství IFN- β došlo až v čase 48 a 72 hpi. V těchto časech zároveň došlo vlivem klíštěcích slin k statisticky významnému zvýšení produkce IFN- β a to o 34 % v čase 48 hpi a o 151 % v čase 72 hpi.

Tento pokus byl následně 2 \times zopakován se stejným výsledkem. Totožný pokus byl proveden rovněž s buněčnou linií IC-21, u které však byla hodnota naměřeného IFN- β natolik nízká, že nemohl být pozorován žádný rozdíl mezi skupinou s přidanými slinami a bez slin.



Obr. 15: Vliv klíštěcích slin (10 μ g/ml) na produkci IFN- β buňkami linie PMJ2-R infikovanými kmenem Hypr (MOI = 4).

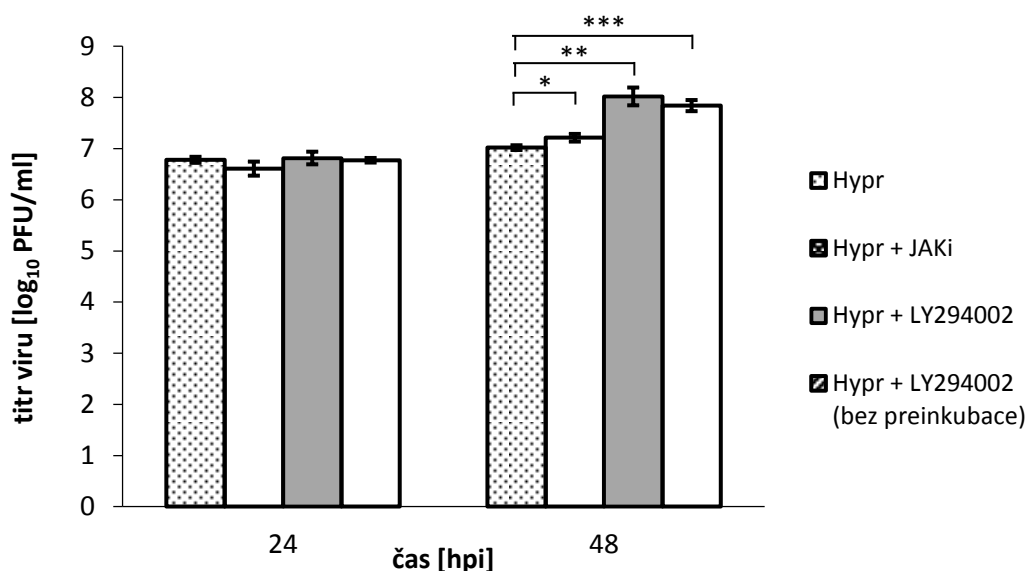
4.5. VLIV INHIBITORŮ JAKi a LY294002 NA REPLIKACI VKE

Tento pokus byl zaměřen na zjištění, zda použití specifických inhibitorů, které ovlivňují signální dráhu spouštěnou IFN- β , bude nějakým způsobem ovlivňovat replikaci VKE v liniích PMJ2-R a IC-21, popř. produkci IFN- β těmito buňkami.

Použité inhibitory byly před infekcí buněk preinkubovány s buňkami po dobu 30 minut a poté byly teprve infikovány kmenem Hypr (MOI = 1). V případě inhibitoru LY294002 byla zahrnuta i skupina bez preinkubace.

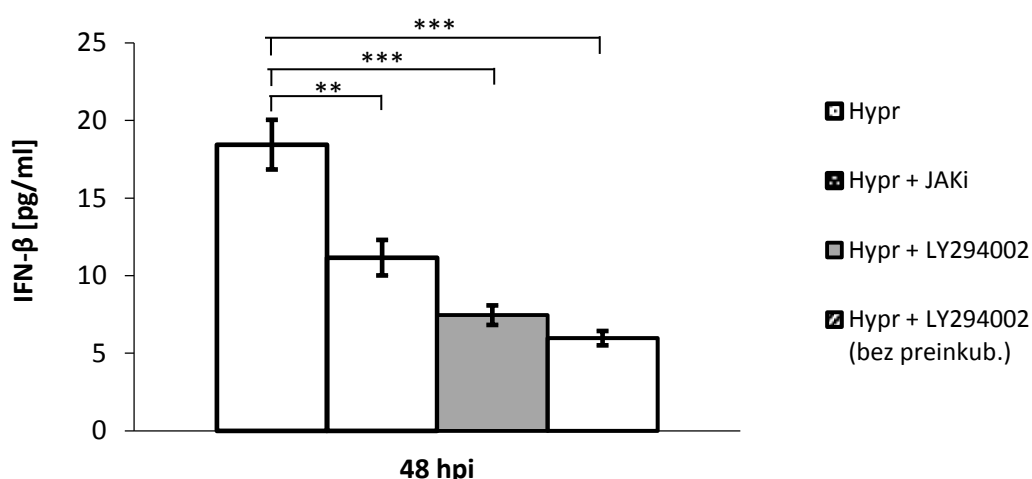
Replikace VKE byla sledována ve dvou intervalech - 24 a 48 hpi (obr. 16). V čase 24 hpi nebyl v titrech viru mezi jednotlivými skupinami zaznamenán žádný signifikantní rozdíl. Po 48 hpi však došlo pod vlivem inhibitoru LY294002 ke statisticky významnému zvýšení titru viru. Zvýšená replikace byla pozorována u obou skupin – tj. jak u skupiny preinkubované s LY294002, tak i u skupiny bez preinkubace. K menšímu ale rovněž statisticky významnému zvýšení titru viru došlo i působením inhibitoru JAKi.

Stejný pokus byl proveden i s linií IC-21, u které však nebyl mezi jednotlivými skupinami ani pro jeden časový interval zaznamenán žádný rozdíl.



Obr. 16: Vliv inhibitorů JAKi (výsl. konc. 1 μ M) a LY294002 (výsl. konc. 10 μ M) na replikaci viru v linii PMJ2-R infikované kmenem Hypr (MOI = 1).

Kromě vlivu inhibitorů na replikaci VKE byl rovněž sledován jejich vliv na množství IFN- β , které infikované makrofágy vyprodukovaly. Množství IFN- β bylo stanovováno pouze u linie PMJ2-R a to v čase 48 hpi (obr. 17). Pod vlivem obou inhibitorů došlo k signifikantně snížené produkci IFN- β . Působením inhibitoru JAKi došlo ke snížení množství IFN- β o 40 % a pod vlivem inhibitoru LY294002 činil pokles 60 % u skupiny s preinkubací a 67 % u skupiny s inhibitorem bez preinkubace.



Obr. 17: Vliv inhibitorů JAKi (výsl. konc. 1 μ M) a LY294002 (výsl. konc. 10 μ M) na produkci IFN- β buňkami linie PMJ2-R infikovanými kmenem Hypr (MOI = 1).

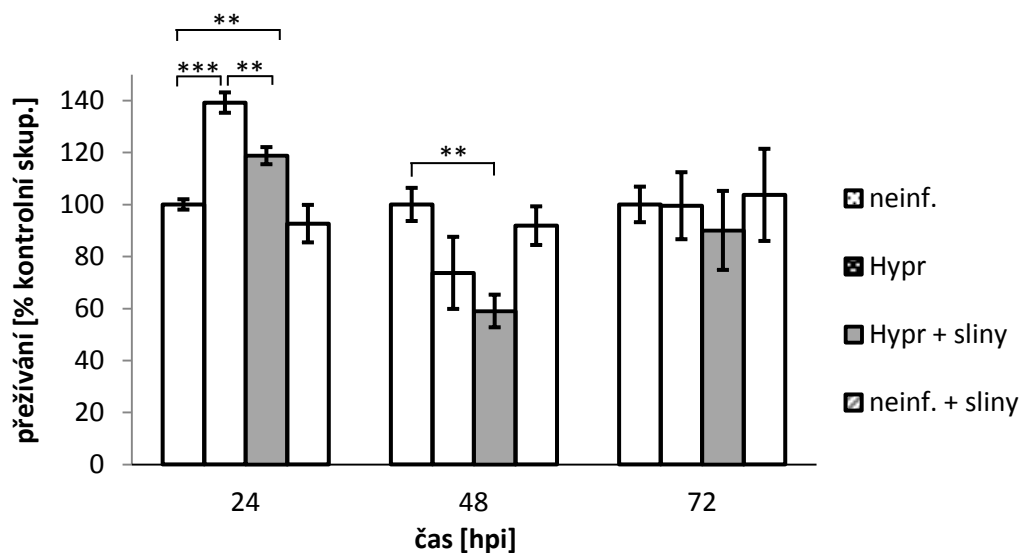
U linie IC-21 nebylo množství IFN- β stanovováno a to jak z důvodu toho, že se při sledování vlivu inhibitorů na replikaci neprojevil žádný rozdíl mezi skupinami, tak i proto, že v předchozích pokusech bylo u linie IC-21 naměřeno jen velmi malé množství IFN- β .

4.6. PŘEŽÍVÁNÍ A APOPTÓZA INFIKOVANÝCH MAKROFÁGŮ OVLIVNĚNÝCH KLÍŠTĚCÍMI SLINAMI

Cílem těchto pokusů bylo zjistit, zda infekce kmenem Hypr ovlivňuje přežívání a apoptózu buněk a zda dochází k nějaké změně v přítomnosti klíštěcích slin.

Přežívání buněk bylo sledováno u linie PMJ2-R v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po infekci kmenem Hypr (MOI = 4) (obr. 18). Metoda použitá na posouzení životaschopnosti buněk byla založena na metabolické aktivitě buněk, při níž docházelo ke změně vlastností použitého barviva, které se ze slabě fluorescenčního měnilo na silně fluorescenční. Míra fluorescence byla poté snadno detekována.

V čase 24 hpi vyvolala infekce kmenem Hypr statisticky významný nárůst v přežívání buněk a to o 39 % (obr. 18). Tento nárůst v přežívání infikovaných buněk byl zároveň signifikantně snížen v přítomnosti klíštěcích slin a to o 20 %. U skupin neinfikovaných buněk a neinfikovaných buněk s přidanými slinami se přežívání nelišilo. V čase 48 hpi byl u obou skupin infikovaných buněk naopak pozorován pokles v přežívání, který byl signifikantní pouze v případě skupiny infikovaných buněk s přidanými slinami (pokles vůči neinf. buňkám o 41 %). V čase 72 hpi nebyl mezi skupinami patrný žádný signifikantní rozdíl.



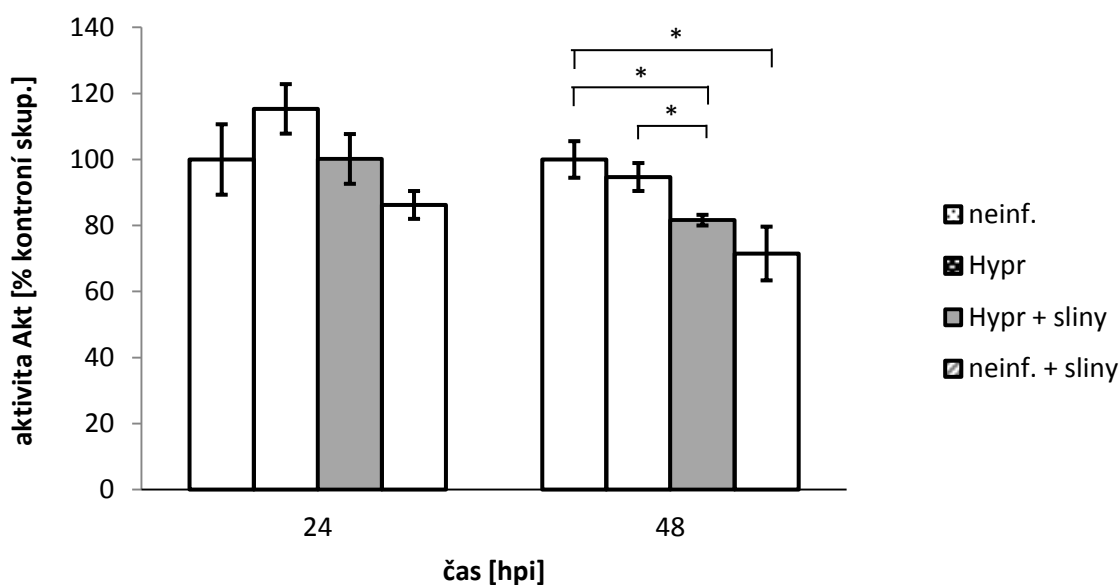
Obr. 18: Přežívání u buněk linie PMJ2-R infikovaných kmenem Hypr (MOI = 4) v porovnání s neinfikovanými buňkami (kontrolní skupina) a ovlivnění přežívání klíštěcími slinami (10 µg/ml); jako 100 % zvolena průměrná hodnota kontrolní skupiny.

Kromě detekce aktivity metabolismu buněk, bylo přežívání buněk posuzováno z pohledu přítomnosti fosforylované (aktivní) formy Akt kinázy, která má antiapoptický účinek a podporuje tím přežívání buněk.

Aktivita Akt byla stanovována v časových intervalech 24 a 48 hpi pomocí APC značené protilátky proti fosforylované formě Akt. Naměřená míra fluorescence odpovídající množství aktivované Akt v jednotlivých vzorcích byla vyjádřena jako aktivita Akt v procentech.

V čase 24 hpi byl naznačen podobný trend jako v předchozím případě u posuzování přežívání buněk (obr. 19). V reakci na infekci kmenem Hypr došlo ke zvýšení aktivované Akt, která byla vlivem klíštěcích slin snížena. Tento trend však nebyl u žádné skupiny statisticky průkazný.

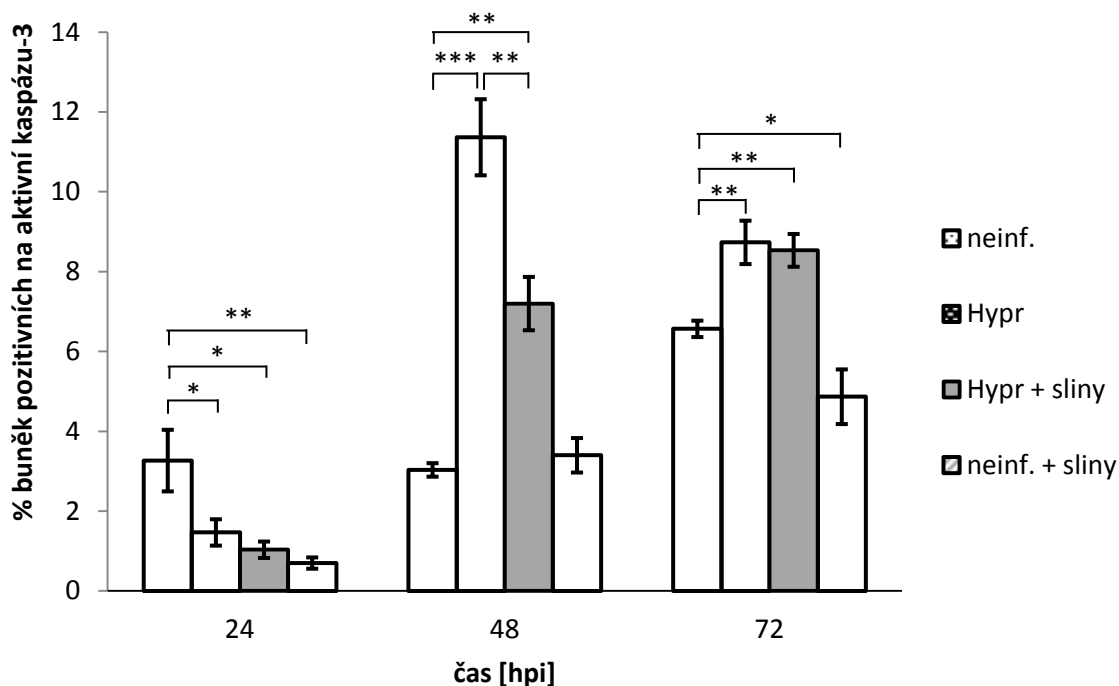
Po 48 hodinách bylo naopak pozorováno u infikovaných skupin snížení aktivní formy Akt. Po přidání klíštěcích slin navíc došlo k signifikantnímu snížení Akt vůči skupině infikovaných buněk a to o 13 %. Statisticky významné snížení však bylo sledováno po přidání klíštěcích slin i u skupiny neinfikovaných buněk (o 28 %).



Obr. 19: Přítomnost aktivní formy Akt u buněk linie PMJ2-R infikovaných kmenem Hypr (MOI = 4) v porovnání s neinfikovanými buňkami (kontrolní skupina) a ovlivnění aktivity Akt klíštěcími slinami (10 µg/ml); jako 100 % zvolena průměrná hodnota kontrolní skupiny.

Kromě životnosti buněk byla u buněčné linie PMJ2-R sledována míra apoptózy a to prostřednictvím stanovení aktivity kaspázy-3, jejíž fosforylovaná (aktivní) forma hraje důležitou úlohu v procesu apoptózy. Aktivní forma kaspázy-3 byla stanovena pomocí FITC značené protilátky proti fosforylované formě kaspázy-3 a na průtokovém cytometru bylo určeno procento pozitivních buněk v časových intervalech 24, 48 a 72 hpi.

V čase 24 hpi bylo procento buněk s aktivní kaspázou-3 u všech skupin velmi nízké a mírně zvýšené bylo pouze u skupiny neinfikovaných buněk (obr. 20). V čase 48 hpi došlo u infikovaných buněk k signifikantnímu navýšení. Přidané klíštěcí sliny pak u infikovaných buněk způsobily statisticky významný pokles v procentu buněk pozitivních na aktivní kaspázu-3 a to z 11,2 % na 7,4 %. V čase 72 hpi již tento pokles patrný nebyl, ale procento buněk pozitivních na aktivní kaspázu-3 bylo pod vlivem VKE stále signifikantně zvýšené.



Obr. 20: Procento buněk linie PMJ2-R pozitivních na aktivní kaspázu-3 po infekci kmenem Hypr (MOI = 4) a ovlivnění klíštěcími slinami (10 µg/ml).

5. DISKUZE

VKE je klíšťaty přenášený patogen, který způsobuje závažné neuroinfekční onemocnění a řadí se mezi nejvýznamnější arboviry v Evropě a Asii. K přenosu VKE na člověka dochází nejčastěji po přisátí infikovaného klíštěte, kdy se virus dostává do organismu prostřednictvím vylučovaných slin. Mezi buňky tvořící první obrannou linii při vstupu VKE do napadeného organismu patří makrofágy, které představují účinný obranný mechanismus proti invadujícím patogenům (Dörrbecker et al. 2010). Na druhou stranu jsou ovšem makrofágy citlivé k nákaze VKE a v případě jejich infekce představují významné místo pro replikaci viru předtím, než je dosaženo virémie (Labuda et al. 1996).

Hlavním cílem mé práce bylo charakterizovat vztah mezi infekcí VKE a myšími makrofágy a zjistit, zda dochází k ovlivnění tohoto vztahu slinami z klíštěte *Ixodes ricinus*. Zároveň bylo mým úkolem pokusit se objasnit, jakou úlohu hraje při replikaci VKE a jejím ovlivnění klíštěcími slinami produkce interferonu- β a oxidu dusnatého infikovanými makrofágy.

Replikace VKE v myších makrofázích

Pro charakterizování replikace VKE v makrofázích byly použity tři odlišné myší makrofágové linie (PMJ2-R, IC-21 a P388/D1), peritoneální makrofágy (PM) a makrofágy z kostní dřeně (BMM) získané z myši C57BL/6, které byly *in vitro* infikovány dvěma různými kmeny VKE – kmenem Neudoerfl a kmenem Hypr.

Zjistili jsme, že všechny tři použité buněčné linie jsou k nákaze VKE citlivé a dochází v nich k výrazné replikaci VKE charakterizované zvyšujícím se titrem viru v čase (pro 24 a 48 hpi). Tento pozorovaný trend se shoduje například s výsledky práce Ahantarig et al. (2009), ve které byla rovněž sledována replikace VKE a to v buněčné linii IC-21 infikované kmenem Hypr.

K virové replikaci docházelo při použití obou kmenů VKE. Při srovnání replikace těchto dvou kmenů však byla patrná určitá odlišnost. Pozorovali jsme, že kmen Hypr, který je charakterizován vyšší virulencí projevující se především vyšší mírou neuroinvazivnosti (Wallner et al. 1996), dosahuje při replikaci v makrofágových liniích vyšších titerů než prototypový kmen Neudoerfl. Tyto výsledky se shodují například s pozorováním Fialové et al. (2010), která při infekci dendritických buněk (DC) zaznamenala vyšší procento

infikovaných buněk při použití kmene Hypr než při infekci kmenem Neudoerfl. Stejný trend byl zjištěn i při infekci buněk A549 (linie vzniklá z lidských epitelových buněk karcinomu plic) (Överby et al. 2010).

Přestože byla replikace VKE zaznamenána ve všech použitých buněčných liniích, míra replikace byla mezi jednotlivými liniemi odlišná. Nejvyšších titrů VKE bylo dosaženo v linii PMJ2-R, nižší míra replikace byla pozorována v linii P388/D1 a nejméně se virus replikoval v linii IC-21.

Při infekci PM a BMM byl průběh replikace VKE v porovnání s buněčnými liniemi odlišný, neboť VKE dosahoval v těchto makrofázích jen nízkých titrů, které s časem narůstaly pouze pozvolně.

Zda rozdíly v titrech viru u jednotlivých skupin makrofágů odpovídají rozdílnému zastoupení infikovaných buněk, bylo sledováno pomocí imunofluorescenčního značení cíleného na flavivirový E protein. Tento náš předpoklad, že titr viru stanovený ze supernatantu bude korespondovat s množstvím infikovaných buněk, se ukázal být správným a jednotlivé skupiny makrofágů se zastoupením infikovaných buněk vskutku lišily. Nejvíce infikovaných buněk bylo pozorováno u linie PMJ2-R (98,7 %), u linie P388/D1 byla infikována více než polovina (55,0 %) a u linie IC-21 to byla necelá čtvrtina buněk (22,7 %). Nejnižší procento infikovaných buněk bylo stanoveno u BMM (1,7 %) a u PM (< 1 %).

Pro odlišný průběh replikace a rozdílné zastoupení infikovaných buněk v jednotlivých skupinách makrofágů se nabízí vysvětlení, že citlivost k nákaze VKE může být ovlivněna odlišným stupněm diferenciací použitých buněk. Tuto teorii podporuje práce Kopeckého et al. (1991), ve které bylo zjištěno, že PM z nedospělých inbredních myší (stáří 8–11 dní) jsou k infekci VKE prokazatelně vnímavější než PM z dospělých myší (stáří 25–30 dní). Tato hypotéza je podpořena i skutečností, že buňky linie IC-21, ve kterých se virus replikoval méně, jsou více diferenciovány než buňky linie P388/D1 (Walker & Gandour 1980) a jejich fenotyp nejvíce připomíná zralé, diferenciované makrofágy (Chamberlain et al. 2009).

Vliv klíštěcích slin na replikaci VKE

Dalším cílem v mé práci bylo zjistit, zda může přítomnost klíštěcích slin ovlivnit replikaci VKE v myších makrofázích. Vliv klíštěcích slin na virovou replikaci byl již dříve sledován např. u viru vezikulární stomatitidy (Hajnická et al. 1998). V této práci byl prokázán pozitivní účinek SGE z klíšťat *Dermacentor reticulatus* a *Rhipicephalus*

appendiculatus na množení viru. Podobných výsledků bylo dosaženo i v naší laboratoři, kdy došlo pod vlivem slin z klíštěte *I. ricinus* ke zvýšení replikace VKE v infikovaných DC derivovaných z kostní dřeně (nepublikovaná data).

V mé práci se ovšem pozitivní účinek klíštěcích slin na replikaci VKE nepodařilo potvrdit a v časech 24 a 48 hpi byl u linií PMJ2-R a IC-21 naopak pozorován vlivem klíštěcích slin pokles titru viru. Toto snížení bylo v čase 24 hpi u všech provedených pokusů signifikantní a po 48 hpi bylo pozorované snížení rovněž signifikantní, nebo alespoň trendové. V čase 72 hpi již výsledky nebyly tak jednotné a u linie IC-21 došlo vlivem slin ke statisticky významnému zvýšení titru viru, popř. neměly přidané sliny žádný vliv. U linie PMJ2-R bylo po 72 hpi pod vlivem klíštěcích slin pozorováno buď signifikantní zvýšení titru viru, nebo naopak statisticky významný pokles.

Vliv klíštěcích slin na replikaci kmene Hypr byl sledován i u BMM. V tomto případě docházelo vlivem slin po 48 a 72 hpi k trendovému snížení, které však nebylo signifikantní.

Kromě stanovení vlivu klíštěcích slin na množství viru v odebraných supernatantech byl sledován vliv klíštěcích slin na změnu zastoupení infikovaných buněk. V tomto pokuse byla použita linie IC-21 a peritoneální makrofágy. Rozdíly v zastoupení infikovaných buněk byly posuzovány v čase 48 hpi. Bylo zjištěno, že pod vlivem klíštěcích slin došlo u linie IC-21 k signifikantnímu snížení počtu infikovaných buněk (ze 43,1 % na 16,7 %). Tyto výsledky odpovídají pozorovanému snížení titru viru pod vlivem slin.

U PM bylo zjištěno jen velmi malé množství infikovaných buněk (méně než 1 %) a vliv klíštěcích slin proto nemohl být věrohodně zhodnocen. Klíštěcími slinami nebyl v tomto případě ovlivněn ani titr viru. Při fluorescenční mikroskopii však bylo pozorováno, že kromě adherentních PM byly přítomné i jiné menší buňky kulatého tvaru, které byly na rozdíl od PM téměř všechny infikované a stanovený titr viru tudíž může být zkreslen přítomností jiných infikovaných buněk a nemusí odpovídat skutečné replikaci viru v PM.

Tyto výsledky se, stejně jako v případě vlivu slin na replikaci viru, neshodují s dosud publikovanými pracemi. Rozdílné působení klíštěcích slin bylo pozorováno u DC izolovaných ze sleziny, u kterých bylo pod vlivem slin prokázáno zvýšené procento infikovaných buněk a to při infekci kmenem Hypr i kmenem Neudoerfl (Fialová et al. 2010). Odlišné výsledky pozorované u makrofágů a dendritických buněk mohou vycházet z toho, že makrofágy zřejmě nehrají při šíření VKE z místa přisátí klíštěte do organismu tak důležitou roli jako DC (např. Langerhansovy buňky), které se zásadně podílejí na transportu viru do uzlin (Labuda et al. 1996).

I když je snížení titru viru vlivem klíštěcích slin neobvyklé, byly obdobné výsledky jako v mé práci pozorovány i při infekci lidských myeloidních DC virem dengue, kdy přítomnost slin z komára *Aedes aegypti* snižovala procento infikovaných DC (Ader et al. 2004).

Úloha NO

Dalším cílem mé práce bylo zjistit, zda dochází vlivem infekce VKE k produkci oxidu dusnatého (NO). V některých pracích bylo prokázáno, že infekce peritoneálních makrofágů určitými flaviviry (např. virem žluté zimnice, virem encefalitidy Saint Louis) vede k produkci NO (Barros et al. 2009). Stejně zjištění pro VKE dokládá ve své práci i Plekhova et al. (2007).

Rovněž byl prokázán antivirový účinek NO během replikace flavivirů a to například u japonské encefalitidy (Lin et al. 1997) či dengue viru (Takhampunya et al. 2006).

Pokusy, ve kterých jsem ve své práci stanovovala množství NO, byly prováděny s kmenem Neudoerfl i virulentnějším kmenem Hypr a produkce NO byla sledována v časech 24, 48 a 72 hpi. Z buněčných linií byly používány pouze linie IC-21 a PMJ2-R, neboť u linie P388/D1 bylo prokázáno, že na rozdíl od ostatních makrofágů u ní nedochází po stimulaci LPS či IFN- γ k syntéze NO (Stuehr & Marletta 1987; Walloschke et al. 2010).

Ačkoliv některé práce nasvědčují tomu, že jsou makrofágy schopné po infekci flaviviry produkovat NO, nebyla u žádné z použitých linií ani u PM či BMM zaznamenána zvýšená produkce NO vlivem infekce VKE. Zvýšené množství NO nebylo stanoveno ani v případě zvýšení infekční dávky na MOI = 10 a ani po prodloužení sledovaného časového intervalu na 96 hpi (u PM). Žádné rozdíly nebyly patrné ani v případě, že byly vzorky používané pro měření obsahu NO²⁻ odebírány ze supernatantu nebo z buněčné suspenze.

I když bylo v některých pracích prokázáno, že NO zastává při virové infekci protektivní úlohu, jiné práce naopak potvrzují naše výsledky. Kreil & Eibl (1995) ve své práci zjistili, že PM infikované VKE neprodukuje spontánně NO a virová infekce v tomto případě pouze „připravuje“ makrofágy na produkci NO a k jejich aktivaci je zapotřebí ještě další signál. Rovněž bylo zjištěno, že NO nesnižuje v případě infekce VKE virovou replikaci *in vitro* a při použití inhibitoru NO (aminoguanidinu) naopak dochází k prodloužení průměrné doby přežití myši infikovaných VKE (Kreil & Eibl 1996). Toto pozorování poukazuje na to, že by infekce VKE mohla spíše než k obraně přispívat k patogenezi onemocnění.

Úloha IFN- β

Dalším cílem mé práce bylo zjistit, jakou úlohu hraje u infikovaných makrofágů produkce IFN- β . U řady virů bylo pozorováno, že po jejich infekci dochází k tvorbě IFN- β (Takeuchi & Akira 2009). Rovněž byla prokázána důležitost antivirového působení IFN- β u VKE (kmene Hypr) a Langat viru, který patří spolu s VKE mezi viry komplexu klíšťových encefalitid. Bylo zjištěno, že při použití knockoutovaných modelů myši s absencí interferonového systému bylo u těchto myši pozorováno více fatálních neurologických příznaků vyvolaných infekcí VKE nebo Langat virem (Weber et al. 2014).

Ve své práci jsem zjistila, že liniové makrofágy PMJ2-R produkují IFN- β jak po infekci virovým kmenem Neudoerfl, tak i v případě infekce kmenem Hypr, přičemž infekce virulentnějším kmenem Hypr má za následek vyšší produkci IFN- β . Stejně výsledky, kdy infekce virulentnějším kmenem vyvolala výraznější interferonovou odezvu, byly pozorovány i v práci Fialové et al. (2010) a Överby et al. (2010).

Zajímavé je rovněž pozorování, že ke zvýšené produkci IFN- β docházelo až po 48 hpi a nejvýraznější byla produkce až po 72 hpi. Toto zjištění se shoduje s prací Överby et al. (2010), která uvádí měřitelnou produkci IFN- β až 24 hpi. Toto zpoždění je vysvětleno tím, že se replikace virových částic odehrává v membránách na endoplazmatickém retikulu, kde se VKE ukrývá před rozpoznáním imunitními mechanismy hostitele (Överby et al. 2010; Miorin et al. 2012). Tento posun v produkci IFN- β může způsobit, že dojde k infekci okolních buněk dříve, než u nich dojde k navození antivirového stavu. Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že VKE narušuje JAK/STAT signální dráhu (Best et al. 2005; Werme et al. 2008), tak opožděná produkce IFN- β může mít za následek oslabení antivirových účinků IFN- β .

Stejný trend v produkci IFN- β jako u linie PMJ2-R byl pozorován i po infekci kmenem Hypr u linie P388/D1, kdy došlo k nárůstu v produkci IFN- β rovněž až po 48 hpi. U linie IC-21 byla produkce IFN- β odlišná a byly stanoveny o poznání nižší hodnoty vyprodukovaného IFN- β . Když byl pokus s linií IC-21 zopakován, nebyl naměřen téměř žádný IFN- β . Toto zjištění může vypovídat o tom, že námi používané buňky této linie mají nějaký defekt v interferonové dráze.

U PM bylo maximum produkce IFN- β patrné 24 hpi a poté množství IFN- β mírně klesalo. Hodnoty vyprodukovaného IFN- β byly v porovnání s liniemi PMJ2-R a P388/D1 značně nižší. Stejný trend byl zaznamenán i v případě BMM. Nízké množství IFN- β stanovené u PM a BMM lze vysvětlit tím, že bylo v porovnání s liniovými makrofágy

infikováno jen malé procento buněk a produkce IFN- β tedy nemohla dosahovat tak vysokých hodnot.

Vliv klíštěcích slin na produkci IFN- β

Při posuzování úlohy klíštěcích slin jsme zjistili, že pod vlivem klíštěcích slin dochází k signifikantnímu zvýšení produkce IFN- β a to o 34 % v čase 48 hpi a o 151 % v čase 72 hpi. Tyto výsledky korespondují s podobným experimentem provedeným v naší laboratoři na myeloidních DC, kdy byla pod vlivem klíštěcích slin pozorována zvýšená aktivita STAT1 (nepublikovaná data), k jehož aktivaci dochází poté, co je následkem navázání interferonu na IFNAR spuštěna JAK/STAT signální dráha (McNab et al. 2015).

Ze získaných výsledků je zřejmé, že mezi zvýšenou produkcí IFN- β a změnou replikace VKE pod vlivem klíštěcích slin u linie PMJ2-R není přímá souvislost.

Výsledky v čase 48 hpi naznačují, že zvýšená produkce IFN- β pod vlivem klíštěcích slin by mohla vést ke snížení virové replikace v tento časový interval. Tomu však odporuje odlišný charakter replikace VKE v čase 72 hpi, kdy bylo při zvýšené produkci IFN- β pozorováno signifikantní snížení nebo naopak zvýšení titru viru. Této skutečnosti, že zvýšená produkce IFN- β neovlivňuje replikaci VKE, nasvědčuje i fakt, že stejný vliv klíštěcích slin na replikaci VKE byl prokázán i u linie IC-21, u níž přitom nedocházelo k navýšení produkce IFN- β .

Omezený antivirový účinek IFN- β byl pozorován již dříve u infekce virem dengue (Diamond et al. 2000). V této práci bylo zjištěno, že IFN- β má sice antivirový účinek, ale důležitou roli přitom hraje čas působení. V případě, že byl IFN- β přidán k buňkám před infekcí, byl virus na účinky IFN- β citlivý a docházelo ke snížení titru viru. Pokud byl však přidán k infikovaným buňkám 4 nebo 24 hodin po infekci, tak ovlivnil replikaci viru jen velmi omezeně.

Vliv inhibitorů LY294002 a JAKi na replikaci VKE a produkci IFN- β

V této sérii pokusů bylo naším hlavním cílem zjistit, zda dochází při narušení IFN signalizace pomocí specifických inhibitorů k nějaké změně replikace VKE a schopnosti produkovat IFN- β . Použitými inhibitory byly Jak inhibitor I (JAKi), který má inhibiční účinek na kinázy z rodiny JAK (Thompson et al. 2002), a inhibitor LY294002, který specificky inhibuje PI3K (Vlahos et al. 1994), jenž je zahrnuta v PI3K/Akt dráze, k jejíž aktivaci dochází po navázání IFN typu I na IFNAR (Hervas-Stubbs et al. 2011).

V případě použití obou inhibitorů byl v čase 48 hpi zaznamenán signifikantní pokles v produkci naměřeného IFN- β . Tento pokles byl výraznější v případě použití LY294002. Snížená produkce IFN- β zároveň odpovídala signifikantnímu zvýšení titru VKE. Toto zvýšení titru viru bylo opět výraznější v případě použití inhibitoru LY294002.

Naše zjištění naznačují, že replikace VKE je ovlivněna působením IFN- β a v případě, že je hned na počátku infekce zablokována interferonová signální dráha, tak dochází k narušení zpětnovazebné regulace produkce IFN- β a ke snížení množství vyprodukovaného IFN- β . To následně vede ke zvýšení replikace VKE.

Narušená produkce IFN- β vyvolaná flavivirovou infekcí pod vlivem působení LY294002 byla pozorována již dříve a to u viru japonské encefalitidy a viru dengue (Chang et al. 2006). Srovnatelné výsledky byly rovněž zaznamenány v případě infekce myších peritoneálních makrofágů virem vezikulární stomatitidy, kdy použití inhibitoru LY294002 vyvolalo snížení exprese IFN- β a zvýšení virové replikace (Schabbauer et al. 2008).

Přežívání a apoptóza u infikovaných buněk pod vlivem klíštěcích slin

Posledním bodem v mé práci bylo zjistit, zda se u infikovaných makrofágů mění míra apoptózy a životnost buněk a zda jsou tyto parametry ovlivněny klíštěcími slinami. Pokusy byly provedeny na buněčné linii PMJ2-R, která byla infikována kmenem Hypr.

Míra apoptózy buněk byla posuzována stanovením množství aktivní formy kaspázy-3, která zastává v procesu apoptózy zásadní roli (Porter & Jänicke 1999). Ve své práci jsem pozorovala, že v čase 24 hpi nedocházelo u infikovaných buněk k téměř žádné apoptóze a mírně vyšší procento buněk pozitivních na kaspázu-3 bylo zaznamenáno pouze u skupiny neinfikovaných buněk. V čase 48 hpi došlo vlivem infekce ke značnému zvýšení procenta apoptotických buněk, které bylo zároveň signifikantně sníženo vlivem klíštěcích slin.

Toto pozorování je shodné s výsledky Fialové et al. (2010), v jejíž práci bylo prokázáno, že infekce kmenem Hypr i kmenem Neudoerfl vyvolává u DC po 48 hodinách zvýšení apoptózy. Rovněž bylo zjištěno, že zvýšené procento apoptotických buněk infikovaných kmenem Hypr je sníženo pod vlivem klíštěcích slin (Fialová et al. 2010). Na rozdíl od našich experimentů bylo ovšem procento virem infikovaných buněk vlivem klíštěcích slin v DC zvýšeno.

V případě makrofágové linie může být snížení procenta apoptotických buněk v přítomnosti slin důsledkem snížení procenta infikovaných buněk.

Na základě metabolické aktivity buněk jsme dále stanovovali životnost makrofágů. Bylo zjištěno, že vlivem infekce dochází po 24 hpi k mírnému zvýšení přežívání. Zvýšené přežívání infikovaných buněk bylo současně signifikantně sníženo vlivem klíštěcích slin. Snížení, i když jen trendové, bylo pozorováno i v čase 48 hpi. V tomto čase byl však zaznamenán i pokles přežívání oproti neinfikovaným skupinám.

Tyto výsledky současně korespondují s naměřenou mírou aktivované formy Akt, která má na životnost buněk významný vliv (Datta et al. 1999).

Pokud infekce buněk vedla ke zvýšení jejich životnosti, tak její snížení klíštěcími slinami lze stejně jako v předchozím případě vysvětlit sníženým procentem infikovaných buněk.

Na základě získaných výsledků lze uvést, že virus klíšťové encefalitidy se v myších makrofázích množí různě v závislosti na jejich diferenciaci. Infikované makrofágy produkují IFN- β , jehož produkce je ovlivněna klíštěcími slinami avšak nesouvisí jednoznačně s mírou virové replikace. Ovlivnění IFN signalizace specifickými inhibitory se ovšem na replikaci VKE projevuje. Virová infekce vyvolává u buněk makrofágové linie apoptózu, která je pod vlivem klíštěcích slin snížena.

6. ZÁVĚR

- VKE se množí v myších makrofázích.

Nejvíce se virus replikuje v makrofágové linii PMJ2-R, méně pak v linii P388/D1 a nejméně v linii IC-21.

V primárních kulturách makrofágů (PM a BMM) se virus množí jen velmi málo.

- Makrofágy infikované VKE neprodukují pod vlivem infekce oxid dusnatý.
- Infikované makrofágy produkují pod vlivem infekce IFN- β .
- Klíštěcí sliny zvyšují u infikovaných makrofágů produkci IFN- β .
- Produkce IFN- β ovlivněná klíštěcími slinami nesouvisí jednoznačně s mírou virové replikace.
- Ovlivnění IFN signalizace specifickými inhibitory JAKi a LY294002 má za následek zvýšení virové replikace.
- Klíštěcí sliny snižují u infikovaných makrofágů apoptózu vyvolanou VKE.

7. SEZNAM ZKRATEK

AP-1	aktivátorový protein 1 (z angl. <i>activator protein 1</i>)
APC	allofykocyanin
BMM	makrofágy derivované z kostní dřeně (angl. <i>bone marrow-derived macrophage</i>)
BOFES	bovinní fetální sérum
CNS	centrální nervová soustava
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DC	dendritické buňky (z angl. <i>dendritic cells</i>)
DC-SIGN	z angl. <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA	dvouvláknová ribonukleová kys. (z angl. <i>double-stranded ribonucleic acid</i>)
ELISA	z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatické retikulum
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
GM-CSF	z angl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
hpi	hodiny po infekci
IFN	interferon
IFNAR	receptor pro IFN- α a IFN- β
IL	interleukin
IRF	interferonový regulační faktor (z angl. <i>interferon regulatory factor</i>)
IRS	inzulinový receptorový substrát (z angl. <i>insulin receptor substrate</i>)
ISG	interferonem stimulované geny
ISGF3	interferonem stimulovaný genový faktor 3
ISRE	z angl. <i>interferon-stimulated response element</i>
JAK/STAT	z angl. <i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
JAK1	z angl. <i>Janus kinase 1</i>
JAKi	JAK inhibitor I (2- <i>tert</i> -butyl-9-fluoro-3,6-dihydro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinoline-7-one)
LPS	lipopolysacharid
LY294002	inhibitor fosfatidylinositol-3 kinázy

M-CSF	z angl. <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MDA-5	z angl. <i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého (e/i/nNOS – endotelová/inducibilní/neuronální NOS)
OAS	2'-5' oligoadenylát syntetáza
ORF	otevřený čtecí rámec (z angl. <i>open reading frame</i>)
PAMP	molekulární struktury typické pro povrch patogenů (z angl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS s 0,05% přídavkem Tween-20
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PKR	proteinkináza R
PM	peritoneální makrofágy
PRR	receptory rozeznávající struktury typické pro patogeny (z angl. <i>pattern recognition receptors</i>)
prM	prekurzor membránového proteinu M
PTS	prekolostrální telecí sérum
RLR	RIG-I-like receptory
RIG-I	z angl. <i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
SAT	slinami aktivovaný přenos (z angl. <i>saliva-activated transmission</i>)
SGE	extrakt ze slinných žláz (z angl. <i>salivary gland extract</i>)
ssRNA	jednovláknová ribonukleová kyselina (z angl. <i>single-stranded ribonucleic acid</i>)
STAT1	z angl. <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
TGF- β	z angl. <i>transforming growth factor β</i>
TLR	Toll-like receptory
TNF	faktor nádorové nekrózy (z angl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TYK2	z angl. <i>tyrosine kinase 2</i>
VKE	virus klíšťové encefalitidy

8. SEZNAM LITERATURY

Abdul-Cader, M. S., Amarasinghe, A., Abdul-Careem, M. F. (2016). Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses; *Archives of Virology*, 161, 2075-2086.

Adami, C., Brunda, M. J., Palleroni, A. V. (1993). *In vivo* immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines; *Journal of Leukocyte Biology*, 53, 475-478.

Ader, D. B., Celluzzi, C., Bisbing, J., Gilmore, L., Gunther, V., Peachman, K. K., Rao, M., Barvir, D., Sun, W., Palmer, D. R. (2004). Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva; *Viral Immunology*, 17, 252-265.

Ahantarig, A., Růžek, D., Vancová, M., Janowitz, A., Št'astná, H., Tesařová, M., Grubhoffer, L. (2009). Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages; *Intervirology*, 52, 283-290.

Akaike, T., Maeda, H. (2000). Nitric oxide and virus infection; *Immunology*, 101, 300-308.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition; *Biochemical Journal*, 357, 593-615.

Alekseev, A. N., Chunikhin, S. P. (1990). The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences); *Parazitologiya*, 24, 177-185.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3; *Nature*, 413, 732-738.

Barros, V. E. D., Ferreira, B. R., Livonesi, M., Figueiredo, L. T. M. (2009). Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses; *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51, 141-147.

Best, S. M., Morris, K. L., Shannon, J. G., Robertson, S. J., Mitzel, D. N., Park, G. S., Boer, E., Wolfenbarger, J. B., Bloom, M. E. (2005). Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist; *Journal of Virology*, 79, 12828-12839.

Bi, Z., Reiss, C. S. (1995). Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide; *Journal of Virology*, 69, 2208-2213.

- Bowman, A. S., Ball, A., Sauer, J. R.** (2008). Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission; *Ticks: biology, disease and control*, 73-91.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brake, D. K., de León, A. A. P.** (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*; *Parasites & Vectors*, 5, 38.
- Brake, D. K., Wikel, S. K., Tidwell, J. P., de León, A. A. P.** (2010). *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages; *Parasites & Vectors*, 3, 103.
- Brierley, M. M., Fish, E. N.** (2002). Review: IFN- α/β receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry; *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22, 835-845.
- Brossard, M., Wikel, S. K.** (2004). Tick immunobiology; *Parasitology*, 129, S161-S176.
- Burke, B., Lewis, C. E.** (Eds.) (2002). *The macrophage*. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Carletti, T., Zakaria, M. K., Marcello, A.** (2017). The host cell response to tick-borne encephalitis virus; *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [Epub ahead of print]
- Datta, S. R., Brunet, A., Greenberg, M. E.** (1999). Cellular survival: a play in three Akts; *Genes & Development*, 13, 2905-2927.
- Dawe, C.J., Potter, M.** (1957). Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse *in vivo* and *in vitro*; *American Journal of Pathology*, 33, 603.
- de Souza, K. P. R., Silva, E. G., de Oliveira Rocha, E. S., Figueiredo, L. B., de Almeida-Leite, C. M., Arantes, R. M. E., Campos, M. A.** (2013). Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement; *Virology Journal*, 10, 267.
- Diamond, M. S., Roberts, T. G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., Harris, E.** (2000). Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons; *Journal of Virology*, 74, 4957-4966.

- Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M., Hufert, F. T.** (2010). Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host; *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 213-222.
- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., Heinz, F. X.** (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia; *Journal of General Virology*, 80, 179-185.
- Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., Amara, A.** (2009). Pathogenesis of Flavivirus infections: using and abusing the host cell; *Cell Host & Microbe*, 5, 318-328.
- Fialová, A., Cimburek, Z., Iezzi, G., Kopecký, J.** (2010). *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells; *Microbes and Infection*, 12, 580-585.
- Francischetti, I. M.** (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals; *Toxicon*, 56, 1130-1144.
- Francischetti, I. M., Sá-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M.** (2009). The role of saliva in tick feeding; *Frontiers in Bioscience*, 14, 2051.
- García-Sastre, A., Biron, C. A.** (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente; *Science*, 312, 879-882.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K.** (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells; *Science*, 327, 656-661.
- Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., Biswas, S. K.** (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function; *Nature immunology*, 17, 34-40.
- Gordon, S., Martinez, F. O.** (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions; *Immunity*, 32, 593-604.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., et al.** (2007). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy; *Virology*, 361, 80-92.
- Gwakisa, P., Yoshihara, K., To, T. L., Gotoh, H., Amano, F., Momotani, E.** (2001). Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription

and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells; *Veterinary Parasitology*, 99, 53-61.

Haglund, M., Günther, G. (2003). Tick-borne encephalitis - pathogenesis, clinical course and long-term follow-up; *Vaccine*, 21, S11-S18.

Hajnická, V., Fuchsberger, N., Slovak, M., Kocáková, P., Labuda, M., Nuttall, P. A. (1998). Tick salivary gland extracts promote virus growth *in vitro*; *Parasitology*, 116, 533-538.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8; *Science*, 303, 1526-1529.

Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system; *Clinical Cancer Research*, 17, 2619-2627.

Horká, H., Černá-Kýčková, K., Skallová, A., Kopecký, J. (2009). Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks; *International Journal of Medical Microbiology*, 299, 373-380.

Chamberlain, L. M., Godek, M. L., Gonzalez-Juarrero, M., Grainger, D. W. (2009). Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88, 858-871.

Chang, T. H., Liao, C. L., Lin, Y. L. (2006). Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF- κ B activation; *Microbes and Infection*, 8, 157-171.

Chen, G., Severo, M. S., Sohail, M., Sakhon, O. S., Wikel, S. K., Kotsyfakis, M., Pedra, J. H. (2012). *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells; *Parasites & Vectors*, 5, 229.

Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J. H., Francischetti, I. M., Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75, 3842-3854.

Ivashkiv, L. B., Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses; *Nature Reviews Immunology*, 14, 36-49.

- Jones, L. D., Davies, C. R., Williams, T., Cory, J., Nuttall, P. A.** (1990). Non-viraemic transmission of Thogoto virus: vector efficiency of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 846-848.
- Jones, L. D., Hodgson, E., Nuttall, P. A.** (1989). Enhancement of virus transmission by tick salivary glands; *Journal of General Virology*, 70, 1895-1898.
- Kaufman, W. R.** (1991). Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch; *Journal of Insect Physiology*, 37, 95-99.
- Kazimírová, M., Štibrániová, I.** (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission; *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43.
- Knowles, R. G., Moncada, S.** (1994). Nitric oxide synthases in mammals; *Biochemical Journal*, 298, 249–258.
- Kopecný, J., Grubhoffer, L., Tomková, E.** (1991). Interaction of tick/borne encephalitis virus with mouse peritoneal macrophages. The effect of antiviral antibody and lectin; *Acta Virologica*, 35, 218-225.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Chavakis, T., Kopecný, J., Pedra, J. H. F., Chmelař, J.** (2015). Modulation of host immunity by tick saliva; *Journal of Proteomics*, 128, 58-68.
- Kramer, C. D., Poole, N. M., Coons, L. B., Cole, J. A.** (2011). Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21; *Experimental Parasitology*, 127, 665-671.
- Kreil, T. R., Eibl, M. M.** (1995). Viral infection of macrophages profoundly alters requirements for induction of nitric oxide synthesis; *Virology*, 212, 174-178.
- Kreil, T. R., Eibl, M. M.** (1996). Nitric oxide and viral infection: No antiviral activity against a flavivirus *in vitro*, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection *in vivo*; *Virology*, 219, 304-306.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., Colonna, M.** (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9; *Blood*, 103, 1433-1437.

- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Štěpánová, G., Macela, A.** (2001). Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages; *Infection and Immunity*, 69, 575-578.
- Kýčková, K., Kopecký, J.** (2006). Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*; *Journal of Medical Entomology*, 43, 1208-1214.
- Labuda, M., Austyn, J. M., Žuffová, E., Kožuch, O., Fuchsberger, N., Lysý, J., Nuttall, P. A.** (1996). Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission; *Virology*, 219, 357-366.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P. A.** (1993a). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks; *Journal of Medical Entomology*, 30, 295-299.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Nuttall, P. A.** (1993c). Enhancement of tick borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts; *Medical and Veterinary Entomology*, 7, 193-196.
- Labuda, M., Nuttall, P. A., Kožuch, O., Elečková, E., Williams, T., Žuffová, E., Sabo, A.** (1993b). Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature; *Experientia*, 49, 802-805.
- Lin, Y. L., Huang, Y. L., Ma, S. H., Yeh, C. T., Chiou, S. Y., Chen, L. K., Liao, C. L.** (1997). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication; *Journal of Virology*, 71, 5227-5235.
- Lindquist, L., Vapalahti, O.** (2008). Tick-borne encephalitis; *The Lancet*, 371, 1861-1871.
- Macháčková, M., Oborník, M., Kopecký, J.** (2006). Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *in vivo*; *Folia Parasitologica*, 53, 153.
- Mans, B. J.** (2010). Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods; *Journal of Innate Immunity*, 3, 41-51.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., Solomon, T.** (2009). Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis; *Journal of General Virology*, 90, 1781-1794.

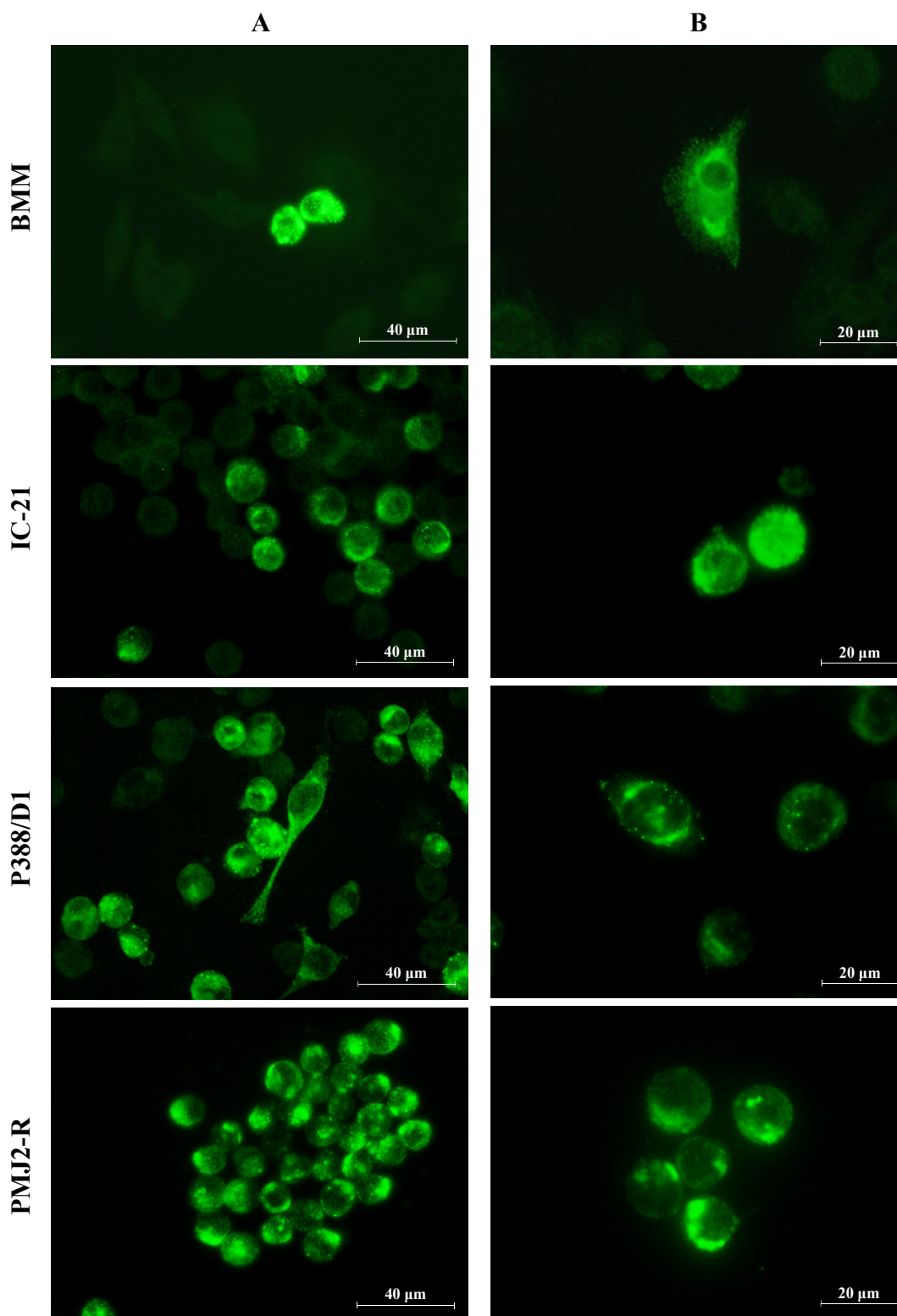
- Mauel, J., Defendi, V.** (1971). Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40; *Journal of Experimental Medicine*, 134, 335-350.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., O'garra, A.** (2015). Type I interferons in infectious disease; *Nature Reviews Immunology*, 15, 87-103.
- Mercer, J., Greber, U. F.** (2013). Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells; *Trends in Microbiology*, 21, 380-388.
- Miorin, L., Albornoz, A., Baba, M. M., D'Agaro, P., Marcello, A.** (2012). Formation of membrane-defined compartments by tick-borne encephalitis virus contributes to the early delay in interferon signaling; *Virus Research*, 163, 660-666.
- Miorin, L., Romero-Brey, I., Maiuri, P., Hoppe, S., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., Marcello, A.** (2013). Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA; *Journal of Virology*, 87, 6469-6481.
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., Kaufman, W. R.** (1994). Adaptations of arboviruses to ticks; *Journal of Medical Entomology*, 31, 1-9.
- Överby, A. K., Popov, V. L., Niedrig, M., Weber, F.** (2010). Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles; *Journal of Virology*, 84, 8470-8483.
- Parihar, A., Eubank, T. D., Doseff, A. I.** (2010). Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death; *Journal of Innate Immunity*, 2, 204-215.
- Perdiguerro, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M. F., Geissmann, F., Rodewald, H. R.** (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors; *Nature*, 518, 547-551.
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., Amara, A.** (2013). Flavivirus entry receptors: an update; *Viruses*, 6, 69-88.
- Pestka, S., Krause, C. D., Walter, M. R.** (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors; *Immunological Reviews*, 202, 8-32.
- Plekhova, N. G., Somova, L. M., Drobot, E. I., Krylova, N. V., Leonova, G. N.** (2007). Changes in the metabolic activity of macrophages under the influence of tick-borne encephalitis virus; *Biochemistry (Moscow)*, 72, 199-207.

- Porter, A. G., Jänicke, R. U.** (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis; *Cell Death and Differentiation*, 6, 99-104.
- R Development Core Team** (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Růžek, D., Dobler, G., Mantke, O. D.** (2010). Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications; *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 223-232.
- Saura, M., Zaragoza, C., McMillan, A., Quick, R. A., Hohenadl, C., Lowenstein, J. M., Lowenstein, C. J.** (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease; *Immunity*, 10, 21-28.
- Schabbauer, G., Luyendyk, J., Crozat, K., Jiang, Z., Mackman, N., Bahram, S., & Georgel, P.** (2008). TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages; *Molecular Immunology*, 45, 2790-2796.
- Schroeder, H., Skelly, P. J., Zipfel, P. F., Losson, B., Vanderplassen, A.** (2009). Subversion of complement by hematophagous parasites; *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 5-13.
- Sonenshine, D. E., Roe, R. M.** (2013). *Biology of ticks*. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Stuehr, D. J., Marletta, M. A.** (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines; *Cancer Research*, 47, 5590-5594.
- Takeuchi, O., Akira, S.** (2009). Innate immunity to virus infection; *Immunological Reviews*, 227, 75-86.
- Takhampunya, R., Padmanabhan, R., Ubol, S.** (2006). Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication; *Journal of General Virology*, 87, 3003-3011.
- Thompson, J. E., Cubbon, R. M., Cummings, R. T., Wicker, L. S., Frankshun, R., Cunningham, B. R., Cameron, P. M., Meinke, P. T., Liverton, N., DeMartino, J. A.** (2002). Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: a Jak protein kinase inhibitor; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1219-1223.

- Uehara, E. U., de Stefano Shida, B., de Brito, C. A.** (2015). Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity; *Inflammation Research*, 64, 845-852.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F.** (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002); *Journal of Biological Chemistry*, 269, 5241-5248.
- Walker, W. S., Gandour, D. M.** (1980). Detection and functional assessment of complement receptors on two murine macrophage-like cell lines; *Experimental Cell Research*, 129, 15-21.
- Wallner, G., Mandl, C. W., Ecker, M., Holzmann, H., Stiasny, K., Kunz, C., Heinz, F. X.** (1996). Characterization and complete genome sequences of high-and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus; *Journal of General Virology*, 77, 1035-1042.
- Walloschke, B., Fuhrmann, H., Schumann, J.** (2010). Macrophage cell line RAW264. 7 but not P-388D1 is an appropriate *in vitro*-model for studying oxidative burst as well as cytokine production in context of fatty acid enrichment; *Cellular Immunology*, 262, 58-61.
- Weber, E., Finsterbusch, K., Lindquist, R., Nair, S., Lienenklaus, S., Gekara, N. O., Janik, D., Weiss, S., Kalinke, U., Överby, A. K., Kröger, A.** (2014). Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses; *Journal of Virology*, 88, 12202-12212.
- Werme, K., Wigerius, M., Johansson, M.** (2008). Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling; *Cellular Microbiology*, 10, 696-712.
- Wikel, S. K.** (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment; *Frontiers in Microbiology*, 4, 337.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses; *Nature Immunology*, 5, 730-737.
- Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern, L., Piesman, J.** (2002). Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific; *The Journal of Parasitology*, 88, 1276-1278.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Imunofluorescenční značení E proteinu VKE (kmen Hypr) u BMM a buněčných linií IC-21, P388/D1 a PMJ2-R; pozorováno při zvětšení 400× (A) a 600× (B).



Příloha 2: Imunofluorescenční značení E proteinu VKE kmene Hypr (zelená) u buněčné linie IC-21 s/bez přidání klíčtějších slin (10 µg/ml); buněčná jádra dobarvena pomocí DAPI (modrá). Pozorováno při zvětšení 400×.

