

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Analýza apoptózy a autofágie v dendritických buňkách
infikovaných virem klíšťové encefalitidy**

Diplomová práce

Bc. Anna Kovaříková

Školitelka: Mgr. Jaroslava Liesková, Ph.D.

České Budějovice 2021

Kovaříková, A., 2021: Analýza apoptózy a autofágie v dendritických buňkách infikovaných virem klíšťové encefalidity. [Analysis of the apoptosis and autophagy in dendritic cells infected with tick-borne encephalitis virus. Mgr. Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was to analyse the process of apoptosis and autophagy in plasmacytoid dendritic cells and Langerhans cells infected with tick-borne encephalitis virus. Moreover, the thesis evaluates the effect of tick saliva on apoptosis and autophagy in these cells.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice

.....

Anna Kovaříková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. za cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Beránkové a Mgr. Evě Výletové za pomoc v laboratoři a své rodině a blízkým za podporu během celé doby studia.

OBSAH

1	Úvod	1
1.1	Klíšťata	1
1.2	Klíšťová encefalitida	1
1.3	Apoptóza.....	4
1.3.1	Apoptóza v buňkách infikovaných flaviviry	7
1.4	Autofágie	8
1.4.1	Autofágie v buňkách infikovaných flaviviry.....	9
1.5	Dendritické buňky (DC)	10
1.5.1	Plazmacytoidní dendritické buňky (pDC)	11
1.5.2	Langerhansovy buňky (LC).....	12
1.5.3	Vliv flavivirové infekce na dendritické buňky	13
1.5.4	Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky	14
1.5.5	Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky infikované flaviviry	15
2	Cíle práce.....	16
3	Materiály a metody	17
3.1	Materiály.....	17
3.1.1	Myši.....	17
3.1.2	Klíštěcí sliny	17
3.1.3	Buňky	17
3.1.4	Virus	18
3.1.5	Použité chemikálie.....	18
3.2	Metody.....	18
3.2.1	Izolace buněk z kostní dřeně	18
3.2.2	Nasazení a kultivace buněk	18
3.2.3	Sortování buněk.....	20
3.2.4	Inkubace se slinami a infekce buněk	20

3.2.5	Příprava lyzátů.....	21
3.2.6	Western blot.....	22
3.2.7	Array apoptotických proteinů.....	23
3.2.8	Plaková titrace	25
3.2.9	Analýza apoptózy na průtokovém cytometru.....	26
3.2.10	Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue	27
3.2.11	Statistické vyhodnocení dat	28
4	Výsledky.....	28
4.1	Langerhansovy buňky	28
4.1.1	Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v LC.....	28
4.1.2	Vliv klíštěcích slin na proces autofágie ve virem infikovaných LC.....	29
4.1.3	Vliv klíštěcích slin na proces apoptózy ve virem infikovaných LC.....	30
4.2	Plazmacytoidní dendritické buňky	32
4.2.1	Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v pDC	32
4.2.2	Vliv klíštěcích slin na přežívání buněk ve virem infikovaných pDC.....	33
4.2.3	Vliv klíštěcích slin na proces apoptózy ve virem infikovaných pDC	34
4.2.4	Vliv klíštěcích slin na expresi apoptotických proteinů ve virem infikovaných pDC.....	37
5	Diskuze.....	41
6	Závěr.....	46
7	Seznam použitých zkratk	47
8	Seznam použité literatury	50

1 ÚVOD

1.1 KLÍŠŤATA

Klíšťatovci (*Ixodida*) jsou řád obligátních krev sajících ektoparazitů, kteří systematicky náleží do podtřídy roztočů (*Acari*), třídy pavoukovců (*Arachnida*), podkmene klepítkačů (*Chelicerata*) a kmene členovců (*Arthropoda*). Tento řád se dělí do 4 čeledí – klíšťákovití (*Argasidae*, měkká klíšťata), klíšťatovití (*Ixodidae*, tvrdá klíšťata) a méně významných čeledí *Nutalliellidae* a *Laelaptidae*, které zahrnují pouze jeden rod. Názvy tvrdá a měkká klíšťata popisují skutečnost, že tělo měkkých klíšťat na rozdíl od klíšťat tvrdých nekryje dorsální štít (Anderson and Magnarelli, 2008).

Životní cyklus klíštěte zahrnuje 4 stádia – vajíčko, larva, nymfa a dospělec. Jelikož všechna klíšťata v určitém stádiu svého vývoje musí sát krev hostitele, patří mezi obligátní ektoparazity. Poté, co larva po sání na hostiteli odpadne, vyvíjí se v nymfu, ze které se stává dospělec, jenž v případě samičky naklade vajíčka, ze kterých se vylíhne larva (Nicholson et al., 2018).

Klíštěcí slinné žlázy během získávání potravy vylučují do kůže hostitele směs fyziologicky aktivních molekul, které plní celou řadu funkcí. Molekuly zajišťují pevné upevnění k hostiteli, vylučování přebytečné vody a iontů, alteraci koagulace, angiogeneze a imunitního systému hostitele (Heyman et al., 2010). Proteiny klíštěcích slin můžou například ovlivnit odpověď dendritických buněk, inhibovat fagocytózu, ovlivnit produkci prozánětlivých cytokinů makrofágy nebo se vázat na chemokiny. Takovými mechanismy se klíště snaží uniknout imunitním mechanismům hostitele, aby nebylo zpozorováno a získalo tak delší čas k sání (Robertson et al., 2009). Molekuly klíštěcích slin také zajišťují přenos patogenů, mezi které patří i klíšťová encefalitida (Heyman et al., 2010).

1.2 KLÍŠŤOVÁ ENCEFALITIDA

Virus klíšťové encefalitidy (TBEV), poprvé popsán před více než 75 lety, je původcem vážného onemocnění centrálního nervového systému. Je rozšířen v Evropě a několika oblastech Asie a jeho incidence navzdory existujícímu očkování stále vzrůstá. Existují 3 geneticky velmi podobné virové subtypy – evropský, sibiřský a dálnovýchodní. Zdrojem infekce je pro člověka nakažené klíště, ale byly zaznamenány i případy infekce z konzumace nepasterizovaného mléka (Bogovic, 2015).

Vektorem klíšťové encefalitidy je v západní Evropě převážně *Ixodes ricinus*. Klíště se nakazí virem při sání na infikovaném hostiteli. Virus se v klíštěti replikuje v buňkách střevní stěny, odkud migruje do slinných žláz, které jsou zdrojem infekce pro další hostitele. Nakažené klíště může infekci přenést na následujícího hostitele nebo infikovat další klíště během sousání, kdy v těsné blízkosti sají dvě klíšťata najednou. V druhém zmíněném případě může dojít k přenosu infekce mezi klíšťaty i v případě, že hostitel nemá detekovatelnou hladinu virémie. Po infekci zůstává klíště infikované po celý svůj životní cyklus, přičemž se jako přenašeči uplatňují zejména nymfy, protože jich je mnohonásobně více než dospělců. Nejvyšší nárůst incidence onemocnění nastává v době nejvyšší aktivity klíšťat, která v případě střední Evropy připadá na období od dubna do listopadu. Důležitým faktorem uplatňujícím se ve vzniku přirozeného ohniska je synchronizace larev a nymf na přelomu dubna a května, přičemž jejich sousání na stejném hlodavci vytváří pro vznik takového ohniska ideální podmínky (Mansfield et al., 2009).

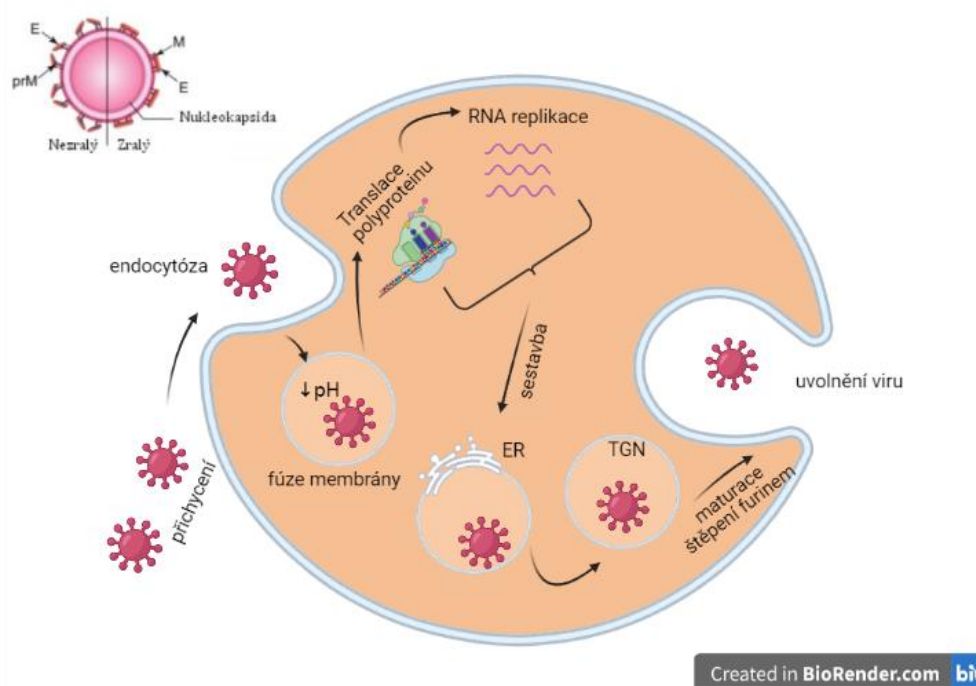
Klíšťová encefalitida patří mezi dvoufázová onemocnění. Jeden až dva týdny po přisátí klíštěte nastává počáteční fáze se symptomy připomínající chřipku. Po odeznění první fáze následuje u 20–30 % pacientů fáze druhá, která se manifestuje jako neurologické onemocnění. Úmrtnost se liší v závislosti na TBEV subtypu. U evropského to jsou 0–1,4 %, ale u dálnovýchodního typu dosahuje úmrtnost až 40 % (Robertson et al., 2009).

TBEV patří do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae*. Flaviviry jsou malé viry o průměru 40–60 nm se sférickou strukturou a lipidovým obalem. Genom viru se skládá z jednořetězcové RNA o pozitivní polaritě a velikosti 11 kb. Otevřený čtecí rámec kóduje sedm nestrukturálních proteinů, které jsou zodpovědné za replikaci viru v buňce, a tři proteiny strukturální – kapsidový protein C, membránový protein M a velký obalový glykoprotein E (Mansfield et al., 2009). Zatímco protein C tvoří kapsidu, která obklopuje molekulu RNA, proteiny M a E jsou inkorporovány do fosfolipidové membrány viru. E protein zodpovídá za interakci s buněčnými receptory a fúzi s buněčnou membránou a indukuje tvorbu virus neutralizačních protilátek (Gritsun et al., 2003).

Prvními buňkami, ve kterých se po přisátí infikovaného klíštěte virus klíšťové encefalitidy replikuje, jsou kožní dendritické Langerhansovy buňky. Tyto buňky transportují virus do lymfatických uzlin, následuje vznik virémie a virus diseminuje do extraneurální tkáně, zejména do sleziny, jater a kostní dřeně. Viremická fáze trvá několik dní. Virus následně způsobem, který není zcela prozkoumaný, prostupuje hematoencefalickou bariérou do mozku. Primárními buňkami, které virus v centrální nervové soustavě infikuje, jsou neurony (Bogovic, 2015). Pro překonání hematoencefalické bariéry je nezbytná dostatečná replikace

viru v primárně infikovaných buňkách. Viry s nízkou schopností nastolit virémii v periferních tkáních jsou daleko méně neuroinvasivní (Růžek et al., 2010).

Cyklus TBEV v hostitelské buňce je znázorněn na obrázku 1. TBEV vstupuje do buněk receptory zprostředkovanou endocytózou nebo mikropinocytózou. Ačkoliv buněčný receptor a konkrétní mechanismus zodpovídající za vstup viru do buňky nebyl identifikován, za hlavní kandidáty se považuje protein vázající laminin (LBP), $\alpha V\beta 3$ integrin a heparansulfát. Po vstupu TBEV do buňky dochází k přeuspořádání virionu v důsledku snižování pH v endozomu. V důsledku změny pH se E a M proteiny začnou odpuzovat, protein E trimerizuje a dojde k odhalení částí proteinů, které zajistí splynutí virové obalové membrány s membránou endozomu. Následně je nukleokapsida uvolněna do cytosolu buňky, kde je rozložena. Tak dochází k uvolnění RNA (Pulkkinen et al., 2018). Replikací RNA se tvoří negativní vlákno RNA, které slouží jako templát pro syntézu pozitivního vlákna. Sestavování nových virových částic probíhá na endoplazmatickém retikulu. RNA genom se obaluje C proteinem do podoby nukleokapsidy. Nezralý a neinfekční virion obsahující proteiny prM a E dozrává v Golgiho aparátu (trans Golgi systém – TGN) rozštěpením spojení proteinu prM a E hostitelskou proteázou furinem. Spolu se vznikem malého M proteinu dochází k reorganizaci proteinu E do formy homodimeru. Takto vyzrálý virion obsahující M protein se stává infekčním a je pomocí transportních váčků, které fúzí s plazmatickou membránou, uvolněn z buňky (Mandl, 2005).



Obr. 1: Cyklus TBEV v hostitelské buňce.

Zdroj: Vlastní zpracování pomocí BioRender.com

Odpověď vrozené imunity se rozvíjí v rámci minut od infekce. Buňky hostitele se snaží limitovat virovou replikaci v infikovaných buňkách. Hlavní roli v antivirové obraně hraje IFN typu I. Signalizace pomocí IFN vede k upregulaci ISGs, které ovlivňují buněčnou syntézu proteinů, poločas života RNA a buněčné přežívání. IFN prvního typu také usnadňují odpověď antivirové adaptivní imunity tím, že indukují maturaci dendritických buněk a prezentaci antigenu prostřednictvím MHC I (Robertson et al., 2009).

Virus je buňkou detekovaný prostřednictvím PRR, což jsou receptory rozpoznávající patogen. Patří mezi ně membránové Toll-like receptory TLR, z nichž nejdůležitější roli hrají TLR3 a TLR7 a TLR8, a cytoplazmatické receptory RIG-I. Signalizace prostřednictvím TLR a RIG-I receptorů vede k aktivaci transkripčních faktorů jako je NF- κ B a interferon regulační faktor IRF-3 a IRF-7. Exprese receptorů, které patogen rozpoznávají, je buněčně specifická (Robertson et al., 2009).

IFN se autokrinním i parakrinním způsobem vážou na buňky a amplifikují tak IFN odpověď. Buňky na takovýto signál reagují stimulací JAK-STAT signalizační dráhy. Kaskádovitou fosforylací kináz dochází k tvorbě komplexu STAT1, STAT2, IRF-9, který tvoří transkripční faktor ISGF3. Tento děj vede k expresi desítek ISGs, které nastolují v buňkách antivirový stav a společně s prozánětlivými cytokiny a chemokiny tvoří odpověď adaptivní imunity (Robertson et al., 2009).

Virus využívá buněčné odpovědi hostitele jako pomocný mechanismus pro svojí replikaci. Jedny z nejdůležitějších mechanismů, které jsou virem ovlivněny, jsou dráhy týkající se buněčné smrti a buněčné odpovědi proti stresu. Takové procesy jsou navzájem propojeny a zahrnují apoptózu a autofagii (Iranpour et al., 2016).

1.3 APOPTÓZA

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je evolučně konzervovaný proces nezbytný pro vývoj embrya, udržení homeostázy a eliminaci infikovaných buněk (Czabotar et al., 2014).

Morfologicky se apoptóza projevuje sraštěním buňky a vzniku buněčných fragmentů, tzv. apoptotických tělísek, které jsou obalené plazmatickou membránou. Tělíska jsou následkem receptorů na povrchu buněk, které vysílají „eat-me“ signál, pozřena fagocytujícími buňkami (Czabotar et al., 2014). Typickým „eat-me“ signálem je například externalizování fosfatidylserinu z vnitřního listu lipidové dvojvrstvy na povrch buňky (Birge et al., 2016). Na rozdíl od nekrózy, kdy dochází následkem velkého rozpínání mitochondrie

a prasknutí membrány k rozvoji zánětlivé odpovědi, je apoptóza velice efektivním a šetrným systémem (Czabotar et al., 2014).

Důležitou roli v procesu apoptózy hraje třída cysteinových proteáz s názvem kaspázy. Kaspázy jsou syntetizované jako inaktivní proenzymy, ale když je buňka odsouzena ke smrti, konvertují se v aktivní proteázy (Steller, 1995). Aktivní proteázy dokáží štěpit důležité buněčné proteiny a zapříčiňují tak typické morfologické znaky apoptózy (Song and Steller, 1999).

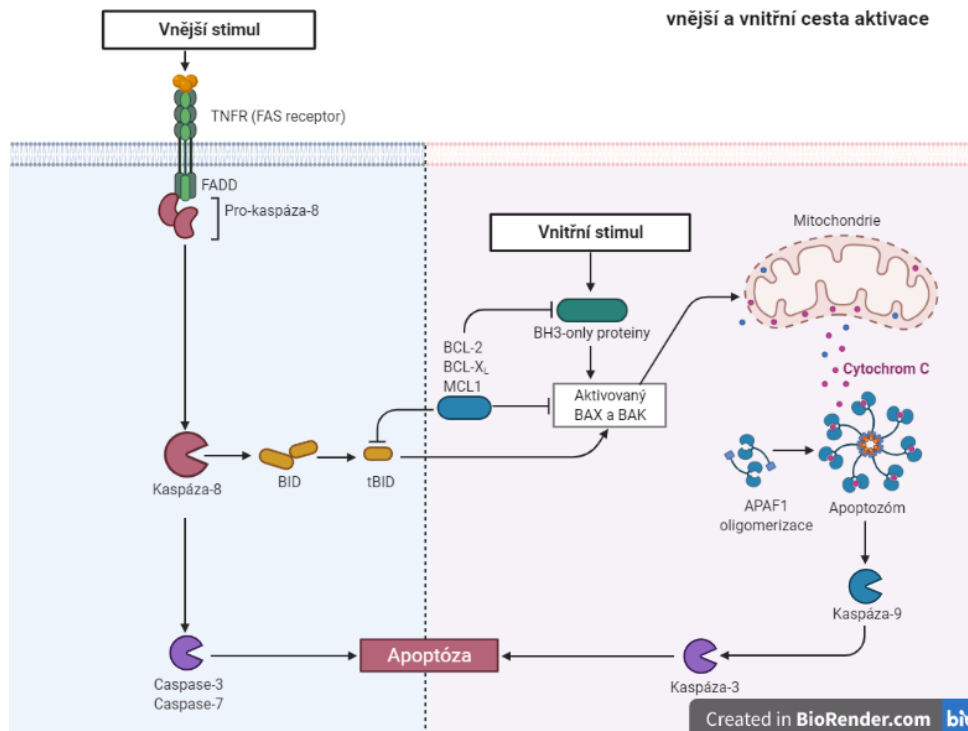
K aktivaci kaspáz může docházet dvěma cestami. První cesta zahrnuje transmembránové receptory na membráně a říká se jí vnější. Druhá cesta se nazývá vnitřní a klíčovým bodem je mitochondrie (Estaquier et al., 2012). Schéma drah apoptózy je znázorněné na obrázku 2.

Vnější cesta aktivace je iniciována skupinou transmembránových receptorů TNFR, kterým se říká receptory smrti. Mezi zástupce této skupiny patří i receptor Fas (také nazývaný Apo1 nebo CD95) (Nair et al., 2014), který odstraňuje aktivované T-lymfocyty na konci imunitní odpovědi. Vazbou extracelulárních ligandů, jako je třeba Fas ligand, na tento receptor dochází k indukci trimerizace receptoru. Trimerizace zapříčiní vznik DISC komplexu skládajícího se z adaptorové molekuly FADD a pro-kaspázy 8. Tak je kaspáza-8 aktivována. Ta následně štěpí downstream zymogeny kaspáz, jako je třeba kaspáza 3, a pro-apoptotického zástupce proteinové rodiny Bcl-2 – protein BID. Tak je signál buněčné smrti znásoben (Song and Steller, 1999).

Při aktivaci kaspázy vnitřní cestou dochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrie. Cytochrom c se za normálních okolností nachází mezi vnitřní a vnější membránou mitochondrie, kde funguje jako důležitá součást dýchacího řetězce. Přesné okolnosti, za kterých je cytochrom c z mitochondrií uvolňován, však nejsou známy. Cytochrom c po uvolnění z mitochondrie oligomerizuje s Apaf-1 a prokaspázou-9. Tak vzniká komplex s názvem apoptozóm. V tomto komplexu aktivovaná kaspáza 9 aktivuje kaspázu 3 a apoptóza je spuštěna (Kuranaga, 2012; Song and Steller, 1999).

Apoptóza

vnější a vnitřní cesta aktivace



Obr. 2: Vnější a vnitřní cesta apoptózy.

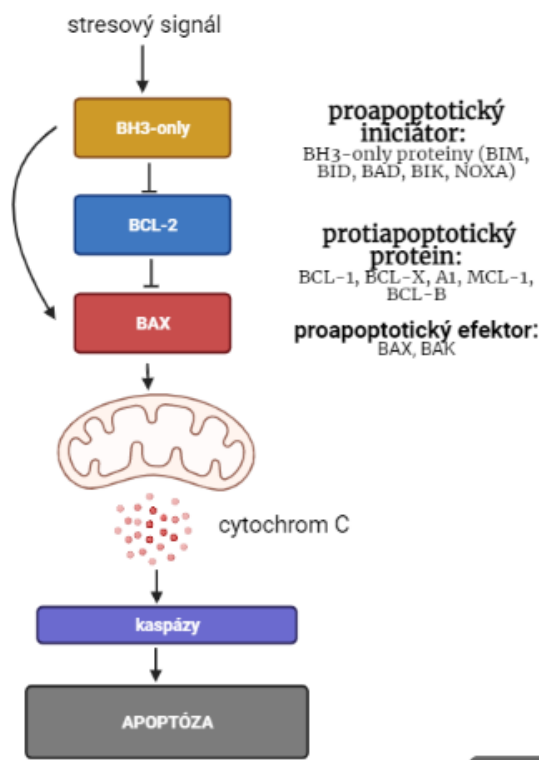
Zdroj: Upravená předloha „Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways“ od BioRender.com (2020)

<https://app.biorender.com/biorender-templates>

O tom, jestli buňka přežije, nebo vstoupí do apoptózy, rozhodují mimo jiné také zástupci proteinové rodiny Bcl-2, jejichž funkce je znázorněna na obrázku 3. Jejich pozměněná exprese je často pozorována u rakovinových onemocnění, kde přispívá k neoplastické buněčné expanzi potlačováním apoptózy, aby tak byl prodloužen život nádorové buňky (Reed, 1998). Ačkoliv má množství zástupců této proteinové rodiny (např. protein Bcl-2) anti-apoptotickou funkci, jiní zástupci, proteiny BAX nebo již zmíněný BID, naopak apoptózu stimulují. Ve zdravých buňkách proteiny podporující přežití zabraňují aktivaci BAX a BAK. Stresové signály aktivují BH3-only proteiny, které se pevně vážou na proapoptotické zástupce Bcl-2 proteinů, čímž zamezují tomu, aby tyto proteiny blokovaly činnost proteinů BAX a BAD. Některé BH3-only proteiny také přímo BAX a BAD aktivují (Adams and Cory, 2018). Přesné účinky Bcl-2 proteinů ale nejsou známy (Song and Steller, 1999). Má se však za to, že regulují buněčnou

smrt prostřednictvím formování pórů v lipidové membráně a tvorby homo- a heterodimerů s ostatními zástupci proteinové rodiny (Minn et al., 1997; Song and Steller, 1999). Umístění Bcl-2 proteinu ve vnější membráně mitochondrií nasvědčuje tomu, že protein znemožňuje apoptózu inhibicí uvolňování cytochromu c z mitochondrie (Kluck et al., 1997).

Do regulace Bcl-2 proteinů je zapojená dráha PI3K/Akt. Dráha PI3K/Akt začíná aktivací PI3K, ke které dochází prostřednictvím receptoru, růstového faktoru nebo cytokinu. Aktivace způsobí fosforylaci PIP₂. PIP₃ poté funguje jako druhý posel umožňující aktivaci Akt například kinázou mTOR. Aktivovaná Akt pak může inhibovat proapoptotické proteiny (například BAD) (Diehl and Schaal, 2013).



Obr. 3: Proteinová rodina BCL-2.

Zdroj: Vlastní zpracování pomocí BioRender.com, inspirováno Adams and Cory, 2018.

1.3.1 Apoptóza v buňkách infikovaných flaviviry

Mnoho virů se snaží procesu apoptózy zamezit nebo ho obejít a otupit tak imunitní odpověď hostitele. Experimenty například ukázali, že DNA viry inhibují buněčnou smrt z důvodu prodloužení infekce a zvýšení produkce viru. Situace s RNA viry se však zdá být komplexnější (Okamoto et al., 2017).

Ovlivnění apoptózy viry se potvrdilo i u infekce flaviviry jako je virus japonské encefalitidy (JEV), Dengue virus (DENV), Langat virus (LGTV) nebo virus západonilské horečky (WNV). Ukázalo se, že tyto viry aktivují několik signálních drah, což ústí v aktivaci nebo potlačení apoptózy ve virem infikovaných buňkách (Okamoto et al., 2017).

Jako příklad proapoptotické aktivity může být uveden virus dengue, což je nejletálnější zástupce ze skupiny Flavivirů. Většina jeho virových proteinů (NS2, NS3, NS5, C a E) spouští vnější dráhu apoptózy v mnoha typech buněk (Ghosh Roy et al., 2014). Konkrétním příkladem je kapsidový protein C, který se nachází v cytoplazmě i v jádře virem infikovaných buněk. Ukázalo se, že jeho lokalizace v jádře je nezbytná pro jeho interakci s proteinem DAXX, který

interaguje s Fas doménou a indukuje tak apoptózu (Netsawang et al., 2010). Proteázová aktivita nestrukturálního proteinu NS3 zase indukuje apoptózu aktivací kaspázy 3 a 8 (Okamoto et al., 2017). DENV ale může spouštět i vnitřní dráhu apoptózy a to virovým proteinem M (Catteau et al., 2003). V některých případech může virus indukovat buněčný stres, ať už prostřednictvím ER, ROS nebo NO, které mohou vyústit v apoptózu (Lin et al., 2002). Zdá se, že disponovat více strategiemi, jak v buňce indukovat apoptózu, je pro virus výhodné pro případ, kdy by jedna z cest buněčné smrti nebyla úspěšná.

Aby WNV podpořil neuroinvazivitu, způsobuje apoptózu v CNS. Kapsidový protein interaguje s p53, který targetuje protein BAX a aktivuje tak vnitřní dráhu apoptózy (Yang et al., 2008). Kapsidový protein WNV má ale i opačný, antiapoptotický účinek, protože přes aktivaci PI3K stimuluje fosforylaci Akt, která potlačí aktivaci kaspázy 3 a 8 (Urbanowski and Hobman, 2013). Nestrukturální protein NS3 stejně jako u viru dengue proteázovou aktivitou stimuluje apoptózu aktivací kaspázy 3 a 8 (Ramanathan et al., 2006).

Virus japonské encefalitidy má podobnou patogenitu jako WNV a taktéž ovlivňuje vnitřní i vnější cestu apoptózy. Taktéž jako WNV a DENV, i nestrukturální protein NS3 JEV indukuje apoptózu, ale v tomto případě její vnitřní cestu, tedy kaspázu 9 a 3 (Yang et al., 2009).

V apoptóze virem infikovaných buněk hrají roli výše zmíněné Bcl-2 proteiny. V případě flavivirů se ukázalo, že oslabují buněčnou proteosyntézu, v důsledku čehož snižují expresi protiapoptotického proteinu MCL-1. Přežití infikované buňky pak závisí na protiapoptotickém proteinu BCL-X_L. Důkazem bylo podání inhibitoru BCL-X_L, které vedlo k BAX/BAK dependentní apoptóze infikovaných buněk. Buňky byly následně fagocytovány makrofágy, což vedlo k inhibici diseminace viru, aniž by vznikla zánětlivá reakce (Suzuki et al., 2018).

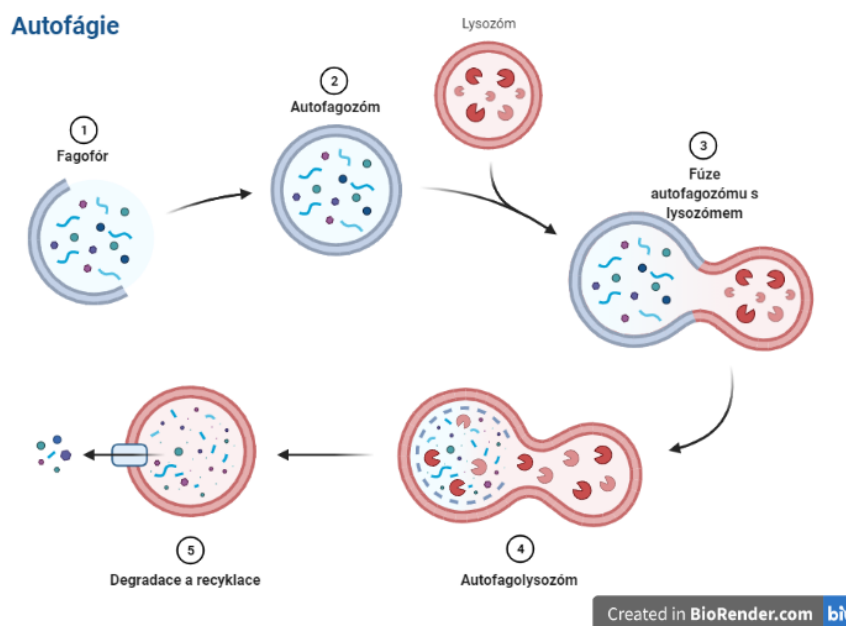
1.4 AUTOFÁGIE

Autofágie je intracelulární proces, při kterém dochází k degradaci buněčných komponent v lysozomu (Mizushima, 2007). Typickým spouštěčem autofágie je nedostatek živin, jako jsou například aminokyseliny (Mortimore and Poso, 1987). Autofáгии ale může navodit také stav hypoxie nebo změna hladiny ATP a inzulinu (Glick et al., 2010). Takovéto signály zaznamená kináza mTOR (Mizushima, 2007), která funguje jako negativní regulátor autofágie. Ve chvíli, kdy dochází k hladovění buňky, je kináza mTOR inhibovaná. Inhibice spustí fosforylaci iniciačního komplexu a autofágie začíná (Iranpour et al., 2016).

Proces autofágie je znázorněn na obrázku 4. Nejdříve dochází k uzavření vnitrobuněčného materiálu včetně organel do typické membrány s názvem fagofór. Fagofór

se prodlužuje, dojde k fúzi konců membrány a stává se z něho dvou membránová organela autofagozóm. Fúzí autofagozómu s lysozómem vzniká autofagolysozóm, který obsahuje degradační hydrolytické enzymy (Iranpour et al., 2016). Lysozomální permeázy a transportéry po degradaci exportují aminokyseliny, nukleotidy a volné mastné kyseliny zpátky do cytoplazmy, kde jsou využity pro energetický metabolismus, produkci makromolekul a biosyntézu. Autofágie proto může být vnímána jako recyklační proces, který navíc ještě generuje ATP a reguluje poškození odstraněním nefunkčních proteinů a organel (Glick et al., 2010; Iranpour et al., 2016).

Proteiny, které jsou do procesu autofágie zapojeny, kódují geny ATG. Proteiny se dělí do pěti kategorií na základě své funkce, mezi které patří odpověď na spuštění kinázy mTOR, formování transportního vezikulu, expanze vezikulu, odloučení jiných Atg proteinů a permeabilizace vakuoly, která umožní eflux aminokyselin z místa degradace (Iranpour et al., 2016). Důležitým proteinem je také LC3, jehož cytosolická forma LC3-I je konjugovaná do fosfolipidu a vytváří tak LC3-fosfatidyletanolamin konjugát označovaný jako LC3-II, který je zabudován do membrány autofagozómu (Tanida et al., 2008).



Obr. 4: Proces autofágie.

Zdroj: Upravená předloha „Autophagy Process“ od BioRender.com (2020)

<https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.4.1 Autofágie v buňkách infikovaných flaviviry

Ačkoliv je autofágie původně fyziologickou odpovědí buňky na stres z prostředí, mnoho virů využívá autofágii jako strategii k přežití (Li et al., 2012).

Monitorováním hladiny proteinu LC3, který je během autofágie lipidován, bylo zjištěno, že virus japonské encefalitidy využívá autofágie ke zvýšení produkce viru (Li et al., 2012). Autofágie také může být zvýšená v buňkách infikovaných DENV (Heaton and Randall, 2011). Co je překvapivé, u WNV se indukce autofágie neprokázala, což naznačuje, že interakce viru s procesem autofágie nejspíše není konzervovaná v rámci čeledi (Vandergaast and Fredericksen, 2012).

Ačkoliv není jasné, jakým způsobem autofágie podporuje replikaci viru, spekuluje se o pěti možných mechanismech. Produkty a orgány vznikající v procesu autofágie mohou usnadňovat vniknutí viru do buňky a sloužit jako scaffoldy pro replikaci. Autofágie také může regulovat metabolismus lipidů, kdy kapky lipidů slouží viru jako zdroj energie během replikace. Virus může dále prodlužovat život buňky, aby získal čas pro svou replikaci. Posledním uvažovaným mechanismem je indukce autofágie pro potlačení imunitní odpovědi hostitele (Iranpour et al., 2016).

1.5 DENDRITICKÉ BUŇKY (DC)

Poprvé byly dendritické buňky identifikovány v epidermis v roce 1868 a byly nazvány Langerhansovy buňky. Přítomnost dendritických buněk i v jiných tkáních byla objevena v roce 1973 (Steinman and Cohn, 1973). Od jiných buněk se dají rozeznat díky své nezvyklé morfologii (tvar hvězdice) a vysoké expresi MHC II molekul (Bell et al., 1999).

Dendritické buňky spojují vrozenou a získanou imunitu. Patří mezi buňky vrozené imunity, protože rozeznávají a odpovídají na PAMPs a DAMPs signály a formují tak akutní zánětlivou odpověď. Hrají ale významnou roli i v získané imunitě, protože pomocí molekul MHC prezentují antigen naivním T-lymfocytům (Collin and Bigley, 2018).

Existují 3 vývojová stádia dendritických buněk. Zatímco prekurzorové DC kolují v krvi a lymfě, nezralé DC se zdržují ve všech tkáních kromě tkáně mozku a varlat a čekají na patogeny, které by mohly zachytit. Zralé DC sídlí v sekundárních lymfatických orgánech (Bell et al., 1999).

Jak už bylo naznačeno, hlavní funkcí dendritických buněk je ochrana vnitřního prostředí a iniciace imunitní odpovědi. Když solubilní antigen pronikne do tkání, tkáňové dendritické buňky ho zachytí pomocí PRR receptoru. Jako odpověď na takový stimul podléhají dendritické buňky programovaným fenotypickým a funkčním změnám zakončených maturací, během níž migrují z periferie do sekundárních lymfatických tkání. Maturací se na dendritických buňkách zvyšuje exprese MHC II molekul, kostimulačních molekul (CD80, CD86) a zánětlivých cytokinů. Dozráním také získají dendritické buňky schopnost aktivovat

specifické T-lymfocyty právě pomocí exprimovaných kostimulačních molekul. Další funkcí DC je indukce imunologické tolerance, kdy dendritické buňky thymu prezentují endogenní peptidy vlastního organismu nově vznikajícím thymocytům a zajistí tak odstranění autoreaktivních T lymfocytů (Bell et al., 1999).

Na rozdíl od B a T-lymfocytů neexistuje pro dendritické buňky žádný společný povrchový antigen, podle kterého by se daly všechny dendritické buňky identifikovat. Je to proto, že se jedná o heterogenní skupinu buněk zahrnující více populací (Liu and Nussenzweig, 2010). Dendritické buňky se dělí do tří skupin, a to na myeloidní (konvenční) linii, lymfoidní (plazmacytoidní) linii a linii dendritických buněk derivovaných z monocytů (MoDC), přičemž myeloidní linie zahrnuje dvě podskupiny – Langerhansovy buňky a intersticiální dendritické buňky (Bell et al., 1999; Collin and Bigley, 2018; Lutz et al., 2017).

1.5.1 Plazmacytoidní dendritické buňky (pDC)

Plazmacytoidní dendritické buňky byly prvně objeveny v krvi a v mandlích (Grouard et al., 1997). Mají excentrické jádro, nápadné endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Jejich dominantní vlastností je produkce interferonů typu I (Collin and Bigley, 2018). Nejdůležitějšími zástupci interferonů typu I je subtyp IFN- α (jen lidských známe 13) a IFN- β (Fensterl and Sen, 2009).

Plazmacytoidní pDC z hlediska vývoje vycházejí ze stejného společného DC progenitoru jako konvenční DC (cDC), ale svou expresí a genetickým profilem připomínají spíše buňky vzniklé z lymfoidní buněčné linie jako jsou T a B lymfocyty (Matta et al., 2010).

Co se týče povrchových markerů, lidské pDC na rozdíl od myeloidních cDC neexprimují antigeny CD11c, CD33, CD11b nebo CD13 (MacDonald et al., 2002). Naopak antigen CD4 exprimují pDC nejvíce ze všech dendritických buněk a monocytů (Jardine et al., 2013). Jelikož hlavní funkcí pDC je produkce interferonu typu I, mají na svém povrchu řadu receptorů, které produkci ovlivňují – CD303 (CLEC4C), CD304 (neuropilin), CD85k (ILT3), CD85g (ILT7), Fc ϵ R1, BTLA, DR6 a CD300A (Collin and Bigley, 2018). Myší pDC se od lidských liší tím, že exprimují CD11c a marker B220, kterým se dají odlišit od konvenčních DC (Colonna et al., 2004; Musumeci et al., 2019).

Zajímavý rozdíl mezi pDC a cDC je jejich expresní profil proteinů Bcl-2 rodiny, který koresponduje s tím, na jakých proteinech závisí jejich přežívání. V porovnání s cDC mají pDC vysokou expresi Bcl-2 a naopak nižší expresi A1. Co se týče MCL-1 a BCL-X_L, je exprese v obou typech buněk srovnatelná. Aplikování specifického inhibitoru Bcl-2 selektivně zabilo

pDC, ale ne cDC. Přidání inhibitoru A1 naopak smrt pDC (na rozdíl od cDC) nezpůsobilo. Pro přežívání obou DC populací je také nezbytný protein MCL-1 (Carrington et al., 2015).

Pro vývoj pDC je klíčová kináza FLT3 a její ligand (FLT3L), bez jejichž signalizace se počet pDC v lymfoidních orgánech a kostní dřeni snižuje (Schmid et al., 2010). Spolu s FLT3 může být generace pDC podpořena i M-CSF (Fancke et al., 2008). Naopak, GM-CSF inhibuje vývoj pDC řízený FLT3L, neboť indukuje signální dráhu, která ruší expresi genů souvisejících s pDC ve FLT3⁺ progenitoru a inhibuje transkripci IRF8, který je pro vývoj pDC také nezbytný (Esashi et al., 2008; Gilliet et al., 2002).

Plazmacytoidní DC rozpoznávají díky Toll-like receptorům TLR7 a TLR9 virovou RNA a DNA a odpovídají na virovou infekci rapidní produkcí interferonu I typu a sekrecí cytokinů (Bao and Liu, 2013). Produkce interferonu I typu je zajištěna pomocí transkripčního faktoru IRF7. zatímco produkce TNF a IL-6 zprostředkovává NF-κB (Honda et al., 2005).

Sekrece IFN typu I pDC jako odpověď na akutní virovou infekci je limitovaná časem i amplitudou. Nejvíce je sekrece patrná brzo po systémové infekci viry jako je cytomegalovirus nebo herpes simplex virus 1, kdy se buňky snaží omezit replikaci viru. Postupně ale začínají být v sekreci IFN typu I dominantní jiné buňky a produkce interferonu pDC ztrácí význam. Když dojde k lokální virové infekci, produkce interferonu typu I pDC má význam pouze pokud jiné obranné linie selhávají. Například v případě plicního onemocnění, který způsobuje virus Newcastleké nemoci, jsou primárním zdrojem IFN typu I alveolární makrofágy a pDC nastupují na scénu v případě, kdy jsou tyto makrofágy eliminovány (Kumagai et al., 2007). Jak se ale ukázalo v pokusu na myši nakažené virem chřipky, odpověď pDC na akutní virovou infekci nemusí být vždy prospěšná. Nadměrná produkce IFN typu I buňkami pDC vyústila v nekontrolovatelný zánět a apoptózu bronchiálního epitelu (Davidson et al., 2014). Zdá se tedy, že vliv pDC na akutní virovou infekci se může lišit v závislosti na konkrétním viru a genetickém pozadí (Swiecki and Colonna, 2015).

Mezi vlastnosti pDC patří ale také prezentace antigenů CD4⁺ T-lymfocytům pomocí exprese MHC II a kostimulačních molekul, ovšem ne tak efektivně, jako to dokážou cDC. V závislosti na kontextu situace vyústí prezentace antigenu v aktivaci CD4⁺ T-lymfocytů nebo v indukci tolerance (Swiecki and Colonna, 2015).

1.5.2 Langerhansovy buňky (LC)

Jak už bylo zmíněno, Langerhansovy buňky byly v roce 1868 prvními poznanými dendritickými buňkami. Jméno dostaly podle svého objevitele, kterým byl Paul Langerhans

(Berger et al., 2006). Jedná se o specializované DC, které osidlují bazální epidermis a jiný vrstevnatý dlaždicový epitel (Collin and Bigley, 2018).

I když byly považovány za typické představitele linie dendritických buněk, protože migrují do lymfatických uzlin a prezentují antigen T-lymfocytům, dají se považovat i za specializovanou podmnožinu makrofágů osidlující tkáň, se kterými sdílí dráhu svého vývoje. Jejich příbuznosti k makrofágům nahrává i fakt, že LC jsou schopné ztráty ve tkáních způsobené migrací do lymfatických orgánů nahrazovat tím, že se samy obnovují nezávisle na kostní dřeni (Doebel et al., 2017). Dendritické buňky s LC fenotypem mohou být derivované z CD14⁺ monocytů za přítomnosti TGF- β , GM-CSF a IL-4 (Geissmann et al., 1998).

Fenotyp LC odpovídá jejich původu a funkci. Reprezentují populaci leukocytů expresí CD45 a myeloidní linie pomocí myeloidních markerů CD33 a CD13. Dále na svém povrchu exprimují lektinový receptor C-typu s názvem langerin (CD207); invariantní MHC I molekulu CD1a; CD11c; adhezivní molekuly β 1 integrin, CD44, CD54 a E-cadherin, který můžeme najít také u keratinocytů. Jako antigen prezentující buňky exprimují také MHC I a II třídy (Valladeau and Saeland, 2005). Charakteristickým znakem je unikátní organela tvaru tenisové rakety s názvem Birbeckova granula. Ty se skládají právě z již zmiňovaného langerinu (Romani et al., 2010).

Úlohou LC je monitorovat své okolí, internalizovat cizí proteiny a vystavit jejich zpracované peptidy na svém povrchu s MHC I nebo II třídy. Peptidy vystavené s MHC I stimulují CD8 (cytotoxické) T-lymfocyty, které následně buňky nakažené virem lyzují. Peptidy prezentované s MHCII jsou rozpoznávané CD4 (pomocnými) T-lymfocyty, které nastolují humorální imunitu (Berger et al., 2006).

1.5.3 Vliv flavivirové infekce na dendritické buňky

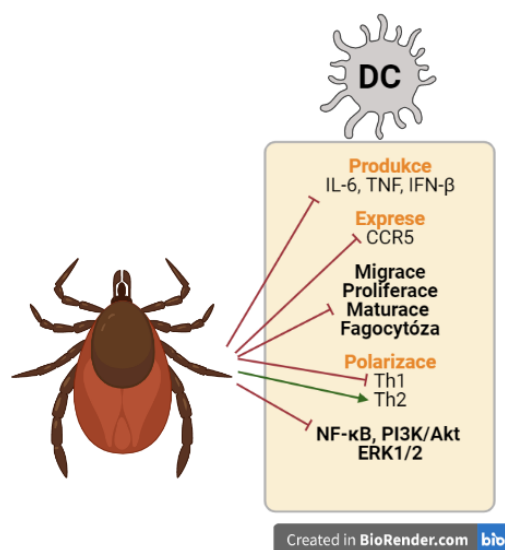
Jak už bylo zmíněno, dendritické buňky hrají zásadní roli ve vrozené imunitě a antivirové odpovědi. Odpověď na infekci se ale mezi subtypy DC liší. To se například ukázalo u infekce WNV a LGTV. Viry v pDC indukují sekreci IFN- α , která není závislá na replikaci viru v buňkách. Jinak je tomu u mDC, jejichž produkce IFN- α na replikaci viru závislá je a hodnoty IFN- α jsou nižší (Robertson et al., 2009; Silva et al., 2007).

Flaviviry ovlivňují i maturaci dendritických buněk. To se ukázalo v případě DC infikovaných DENV. Infikované DC měly sníženou expresi MHC a kostimulačních molekul, zhoršenou schopnost stimulovat proliferaci T-lymfocytů a nedokázaly odpovědět na přídatný maturační stimul TNF- α (Palmer et al., 2005). Takové zjištění je ale v rozporu s dřívějším experimentem, kdy infekce DENV vedla k maturaci DC a stimulovala produkci cytokinů

TNF- α a IFN- α (Libraty et al., 2001). Podobný vliv byl pozorován ve slezinových DC infikovaných TBEV, kdy po infekci buněk došlo ke zvýšení exprese MHC I a MHC II molekul (Fialová et al., 2010).

1.5.4 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky

Jak už bylo zmíněno, klíštěcí sliny plní celou řadu funkcí včetně ovlivnění imunitní odpovědi hostitele. Vlivy, které mají klíštěcí sliny na funkci dendritických buněk, jsou znázorněny na obrázku 5. Jedním z příkladů může být celkový inhibiční efekt slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Sliny inhibují maturaci DC, která je zprostředkována vazbou příslušejících ligandů na CD40 a TLR3, TLR7 a TLR9. Dále inhibují časnou migraci DC z místa zánětu do spádových lymfatických uzlin, snižují schopnost DC prezentovat antigen specifickým T-lymfocytům a navozují protizánětlivou Th2 odpověď. K inhibičnímu efektu slin může docházet prostřednictvím potlačení uvolňování prozánětlivých cytokinů, které se na migraci a maturaci DC podílejí. Konkrétně se jedná o cytokiny IL-1 a TNF- α . (Skallová et al., 2008). Tyto výsledky naznačují, že přítomnost klíštěcích slin zajišťuje, že si DC udrží nezralý fenotyp a zůstávají tak permissivní k virům, které sliny můžou přenášet (Kazimírová et al., 2017). Dále bylo vyzkoumáno, že sliny klíštěte *R. sanguineus* snižují expresi chemokinového receptoru CCR5 na povrchu DC, čímž selektivně inhibují odpověď nezralých DCs na chemotaktický protein MIP-1 α (Oliveira et al., 2008). Inhibice migrace v důsledku snížené exprese CCR5 se potvrdila ve studii, kdy sliny *A. cajennense* inhibovaly migraci DC vůči chemokinu RANTES, který se vedle MIP-1 α na CCR5 váže. V této studii sliny vedly k polarizaci imunitní odpovědi ve prospěch Th2, stimulovaly produkci IL-10 cytokinu dendritickými buňkami po stimulaci ligandem TLR4 a ve zralých DC inhibovaly expresi CD40 a CD86 (Carvalho-Costa et al., 2015). Ukázalo se, že v supresi Th1 imunitní odpovědi v lymfatických uzlinách hrají důležitou roli Langerhansovy buňky. To bylo dokázáno ve experimentu, kdy po sání klíštěte *Ixodes scapularis* na LC deficientní myši došlo oproti jiným zmíněným pokusům k indukci odpovědi Th1 (Vesely et al., 2009). Klíštěcí sliny



Obr. 5: Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky

Zdroj: Vlastní zpracování pomocí BioRender.com (2020). Inspirováno Kotál et al., 2015.

také inhibují interferonovou signalizaci (Lieskovská and Kopecký, 2012a). Další funkcí, kterou klíštěcí sliny v dendritických buňkách ovlivňují, je fagocytóza. Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* snížily fagocytování *Borrelia afzelii* a překvapivě po inkubaci s *B. afzelii* inhibovaly produkci jak cytokinů Th1 (TNF a IL-6), tak Th2 (IL-10) (Slámová et al., 2011). *B. afzelii* figurovala i ve studii zkoumající detaily ovlivnění maturace DC slinami klíštěte *I. ricinus*. Aktivace NF- κ B a dráhy PI3K/Akt byla slinami snížena jak po stimulaci zprostředkovanou TLR2, tak *B. afzelii*. Jako odpověď na *B. afzelii* došlo ke snížení hladiny TNF v DC kvůli selektivní supresi ERK1/2, Akt a NF- κ B (Kotál et al., 2015; Lieskovská and Kopecký, 2012b).

1.5.5 Vliv klíštěcích slin na dendritické buňky infikované flaviviry

Klíštěcí sliny svými mechanismy ovlivňují i procesy probíhající v infikovaných buňkách, včetně dendritických.

Při zkoumání vlivů slin klíštěte *Ixodes ricinus* na dendritické buňky se ukázalo, že sliny zvyšují procento virem infikovaných buněk, snižují apoptózu a snižují produkci prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6, které uvolňují virem infikované buňky (Fialová et al., 2010).

V experimentu na myeloidních DC bylo dokázáno, že sliny klíštěte *Ixodes ricinus* významně zvyšují replikaci viru buňkách a podporují aktivaci antiapoptotické dráhy Akt. V souladu s tím také dochází k potlačení apoptózy. Klíštěcí sliny dále posilňují dráhu JAK/STAT a transkripční faktor NF- κ B. Tyto elementy jsou sice považované za mechanismy antivirové obrany, ale jelikož NF- κ B prostřednictvím aktivace genů imunity, zánětu a proliferace podporuje přežití buňky, není tento fakt s potlačením apoptózy ve prospěch viru v rozporu. (Lieskovská et al., 2018).

2 CÍLE PRÁCE

- Derivace pDC a LC
- Analýza vlivu klíčících slin na replikaci TBEV v plazmacytoidních dendritických buňkách (pDC) a Langerhansových buňkách (LC)
- Analýza apoptózy a autofágie v LC infikovaných virem a ovlivnění slinami
- Analýza přežití pDC infikovaných virem a ovlivnění přežití slinami
- Analýza apoptózy v infikovaných pDC a ovlivnění apoptózy slinami
 - Analýza vazby Annexinu V na fosfatidylserin
 - Analýza exprese apoptotických proteinů

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 MATERIÁLY

3.1.1 Myši

V rámci diplomové práce byli použiti 6-16 týdnů staré inbrední myši kmene C57BL/6N z firmy Velaz. Myši byly chovány za standardních podmínek ve zvěřinci na Katedře medicínské biologie Jihočeské univerzity v klecích s HEPA filtry udržujících prostředí SPF – prosté specifických patogenů.

3.1.2 Klíštěcí sliny

Klíšťata *Ixodes ricinus* byla nasbírána vlnkovou metodu v Branišovském lese v Českých Budějovicích. Samice se nechaly po dobu 6 až 7 dní sát na morčeti. Po nasátí a omytí v 15 % ethanolu se pomocí oboustranné lepící pásky připevnily na podložní sklíčko. Na hypostom a jednu z palp byla klíšťatům nasazena skleněná kapilára, která byla na druhém konci podložního sklíčka podložena plastelínou. Na hřbetní část byly klíšťatům kápnuty 2 μ l 5% roztoku pilokarpinu v 95 % ethanolu. Sklíčka s klíšťaty byla na 2 hodiny umístěna do vlhké komůrky do termostatu při 37 °C. Po 2 hodinách se vyprodukované sliny sesbíraly pomocí balónku z kapilár do mikrozkuřavky. Sliny byly uloženy do mrazáku na -70 °C. K experimentům byly sliny použity po jejich přefiltrování přes 0,22 μ m filtr (Merc Millipore). Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce I.

Tab. I: Seznam chemikálií použitých při slintání klíšťat.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
Pilokarpin	Sigma
Ethanol	Penta

3.1.3 Buňky

Experimenty se prováděly na dendritických buňkách Langerhansových nebo plazmacytoidních. Jejich získání z kostní dřeně myši je popsáno v kapitole 3.2.1 a následná kultivace v kapitole 3.2.2.

K metodě plakové titrace, které je věnována kapitola 3.2.8, byly použity buňky PS (buňky prasečí ledviny, z angl. *porcine kidney stable*) a A549 (buňky lidského adenokarcinomu odvozené od alveolárních buněk typu II).

3.1.4 Virus

K infekci buněk byl použit virus klíšťové encefalitidy kmene Hypr. Kmen Hypr byl izolován v roce 1953 na Moravě z krve desetiletého chlapce, kterému byla diagnostikována klíšťová encefalitida. Virus byl pomnožen na Vero buňkách. Titr zásobního dosahoval $7,7 \cdot 10^7$ pfu/ml. V rámci jednoho experimentu byl k Langerhansovým buňkám přidán virus kmene Hypr, který byl geneticky modifikován vložением červeného fluorescenčního proteinu mCherry. Titr zásobního dosahoval $2,7 \cdot 10^7$ pfu/ml. Tento virus laskavě poskytl prof. Růžek.

3.1.5 Použité chemikálie

Použité chemikálie a kity jsou vypsané v tabulkách u příslušných metod.

3.2 METODY

3.2.1 Izolace buněk z kostní dřevě

Myš byla usmrcena zlomením vazů. Z očištěných holenních a stehenních kostí byly odstrizeny hlavice. Pomocí stříčky s nasazenou jehlou byla kost propláchnuta MEM médiem. Takto získaná kostní dřevě byla rozsuspendována v Petriho misce a profiltrována přes 70 μ m filtr (Corning) do centrifugační zkumavky. Poté byly buňky kostní dřevě centrifugovány (8 min, 250 g, 4 °C). Po centrifugaci a slítí supernatantu byly buňky rozsuspendovány ve 2 ml 0,84 % NH_4Cl ohřátého na 37 °C, čímž došlo k lýze erytrocytů. Lýza byla po 2 minutách zastavena přidáním 10 ml MEM média. V průběhu druhé centrifugace byly buňky spočítány v Bürkerovo komůrce. K počítání byla použita trypanová modř. Následně byly buňky rozsuspendovány v RPMI médiu. Po třetí centrifugaci byly buňky nasazeny na panel. Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce II.

Tab. II: Seznam chemikálií použitých při izolaci buněk z kostní dřevě.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
MEM médium	Biosera
RPMI médium	Biosera

3.2.2 Nasazení a kultivace buněk

V případě derivace Langerhansových buněk byly do kompletního RPMI média (tj. RPMI 1640 + 10 % BOFES, glutamin, merkapt ethanol, antibiotika – směs penicilin + streptomycin) přidány růstové faktory GM-CSF, IL-4 a TGF- β . Složení média popisuje tabulka III. Buňky byly nasazeny po 3 ml do 6-jamkového panelu v koncentraci $2,5 \times 10^5$ buněk/ml. Kultivace

probíhala v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Výměna poloviny média proběhla každý druhý den. Osmý den byly buňky připraveny k experimentu.

Tab. III: Složení média určeného ke kultivaci Langerhansových buněk.

Langerhansovy buňky - médium	
Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
RPMI 1640 médium	Biosera
10 % BOFES	Biowest
2 mM glutamin	Biosera
50 µM merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
1% antibiotika	Biosera
20 ng/ml GM-CSF	PeptoTech
100 ng/ml IL-4	PeptoTech
10 ng/ml TGF-β	PeptoTech

Plazmacytoidní dendritické buňky byly kultivovány v kompletním RPMI médiu s přídavkem Flt-3L a pyruvátu sodného. Složení média popisuje tabulka IV. Buňky byly nasazeny po 2 ml do 6-jamkového panelu v koncentraci $1,5 \times 10^6$ buněk/ml. Kultivace probíhala v inkubátoru (37 °C, 0,5 % CO₂). Výměna poloviny média proběhla čtvrtý a šestý den kultivace. Osmý den byly buňky připraveny k experimentu. Pro zjednodušení byly buňky derivované pomocí Flt-3L označené jako pDC, i když se jednalo o směsnou populaci (Brasel et al., 2000).

Tab. IV: Složení média určeného ke kultivaci plazmacytoidních dendritických buněk.

Plazmacytoidní buňky - médium	
Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
RPMI 1640 médium	Biosera
10 % BOFES	Biowest
2 mM glutamin	Biosera
50 µM merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
1 % antibiotika	Biosera
200 ng/ml Flt-3L	R&D Systems
1 mM pyruvát sodný	Sigma-Aldrich

3.2.3 Sortování buněk

Při dostatečném počtu buněk a funkčnosti sorteru byly Langerhansovy buňky sortovány. Osmý den byly buňky pipetou sesbírány z 6-jamkového panelu do centrifugační zkumavky. Následně byly opláchnuty s PBS a 30 minut na ledu kultivovány s PBS + 5mM EDTA, čímž došlo k uvolnění adherovaných buněk. V některých případech byla místo kultivace s EDTA použita silikonová škrabka. Posbíraná suspenze buněk byla stočena (8 min, 250 g, 4°C) a promyta FACS pufrem (PBS + 1 % BSA + 1 mM EDTA). Buňky byly v 200 µl FACS pufru naznačeny MHC II anti-mouse PE-Cy5 (ředění 100x) nebo MHC II anti-mouse PE (ředění 100x). Výrobci použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce V. Po naznačení a promytí byly buňky přefiltrovány (CellTrics 50 µm, Sysmex) a přeneseny do FACS zkumavek. Následoval sorting MHC II pozitivních buněk na S3e Cell Sorteru Bio-Rad, promytí v RPMI a nasazení buněk na experiment v kompletním RPMI médiu s růstovými faktory.

Tab. V: Seznam chemikálií použitých při sortování buněk.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
EDTA	Sigma-Aldrich
BSA	Biosera
MHC II anti-mouse PE-Cy5 MHC II anti-mouse PE	eBioscience

3.2.4 Inkubace se slinami a infekce buněk

Inkubace se slinami a infekce buněk probíhala na panelu nebo v mikrozkuvkách. Sliny byly k buňkám přidány ve výsledné koncentraci 10 µg/ml. Inkubace se slinami probíhala 2 hodiny v termostatu (37 °C).

Po dvou hodinách byl do odpovídajících jamek/mikrozkuvek přidán virus TBE kmene Hypr v množství MOI 5 (tj. 5 virových částic na buňku) nebo v případě Langerhansových buněk v množství MOI 10 (tj. 10 virových částic na buňku). V rámci jednoho experimentu byl k Langerhansovým buňkám přidán virus označený červeným fluorescenčním proteinem mCherry v množství MOI 5. Do jamek/mikrozkuvek bez viru bylo přidáno odpovídající množství kontrolního média a do jamek/mikrozkuvek se slinami bylo navíc přidáno odpovídající množství slin pro vyrovnání objemové změny. Inkubace s virem probíhala 1 hodinu v termostatu (37 °C).

Po uplynutí inkubační doby byly mikrozkušavky stočeny (4 minuty, 250 g, 4 °C) a buňky opláchnuty s PBS. Buňky tak byly promyty od volných nenávaných virových částic. V případě infekce na panelu byl v rámci zachování i méně adherovaných buněk krok opláchnutí vynechán. Z jamek tak bylo pouze odebráno médium bez přidání PBS. Následně bylo v obou případech k buňkám přidáno odpovídající množství kompletního RPMI média a do odpovídajících jamek opět přidány sliny. Suspenze z mikrozkušavek byla nasazena na panel. Buňky byly na všechny experimenty nasazovány v koncentraci $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Objem buněčné suspenze v jamce závisel na kultivačním panelu (96-jamkový po 200 μ l na jamku, 48-jamkový po 400 μ l, 24-jamkový po 1000 – 1200 μ l).

3.2.5 Příprava lyzátů

Metodě western blot a analýze apoptotických proteinů předcházela příprava lyzátů. Buňky byly nasazeny do panelu v již zmíněné koncentraci $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Buňky určené na western blot byly nasazeny do 48-jamkového panelu po 400 μ l, buňky na array apoptotických proteinů do 24-jamkového panelu po 1 200 μ l.

V určených časových intervalech po infekci bylo z jamek odebráno všechno médium do mikrozkušavek. K buňkám bylo přidáno PBS, které bylo následně přeneseno do mikrozkušavek s médiem. Mikrozkušavky byly stočeny (3 min, 250 g, 4 °C) a zbaveny supernatantu. Tak se zabránilo ztrátě i méně adherovaných buněk. Mezitím bylo do jamek panelu přidáno 150 μ l RIPA pufru s 25 mM NaF, inhibitory proteáz (ředění 100x) a Na_3VO_4 (ředění 100x). Výrobci chemikálií jsou uvedeny v tabulce VI. Panely byly takto 10 minut inkubovány na ledu. Po 10 minutách byly zlyzované buňky přidány k buňkám v odpovídajících mikrozkušavkách a inkubace na ledu pokračovala dalších 10 minut.

Zlyzované buňky byly následně stočeny (5 min, 10 000 rpm, 4 °C) a supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek. Tak byl lyzát zbaven DNA a zbytků membrán. Supernatant byl uchováván v mrazáku na -70 °C až do použití.

Tab. VI: Seznam chemikálií použitých při přípravě lyzátů.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
RIPA pufr	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
Inhibitory proteáz	BioVision
Na_3VO_4	Sigma-Aldrich

3.2.6 Western blot

Proteiny LC3 a P-Akt byly v Langerhansových buňkách detekovány metodou western blot.

Den před samotným western blotem byly připraveny 12% gely. Jejich složení popisuje tabulka VII.

Tab. VII: Složení gelů použitých při metodě western blot.

Chemikálie	Objem na 12% separační gel	Objem na koncentrační gel	Výrobce/Dodavatel
40% akrylamid/bisakryl amid (29:1)	4,5 ml	0,49 ml	VWR Chemicals
4x Tris-Cl/SDS	pH 8,8 - 3,75 ml	pH 6,8 – 1,25 ml	vše VWR Chemicals
H ₂ O	6,75 ml	3,2 ml	
10 % APS	60 µl	30 µl	Sigma-Aldrich
TEMED	12 µl	6 µl	VWR Scientific

Lyzáty, jejichž příprava je popsána v kapitole 3.2.5, byly před nanesením na gel smíchány v poměru 3:1 se vzorkovým pufrům obsahujícím merkaptoethanol (1 díl merkaptoethanol + 9 dílů vzorkového pufru). Směs byla inkubována 3 minuty při 95 °C.

20 µl od každého vzorku a 3,5 µl ELFO markeru bylo naneseno do jamek gelu. Proteiny byly rozděleny elektroforézou za redukujících podmínek v ELFO pufru (25 mM TRIS, 192 mM Glycine, 1% SDS). Parametry byly pro jeden gel nastaveny na 40 mA, 250 V. Elektroforéza běžela 45 minut.

Western blotting probíhal v aparatuře Semi-dry. V transferovém pufru (25,6 mM TRIS, 192 mM glycin, 1,73 mM SDS, 20 % methanol) byl složen sendvič v pořadí – filtrační papíry, membrána, gel, filtrační papíry. Blotovací membrána byla zapojena do zdroje s nastavenými parametry 63 mA, 150 V. Blotování probíhalo 1,5 hodiny.

Membrána s přeblovanými proteiny byla promyta roztokem TBS s 0,1% Tweenem. Poté byla namočená do 5% odtučněného mléka v TBS s 0,1% Tweenem a nechala se 1 hodinu při pokojové teplotě vysycovat na třepačce.

V dalším kroku se membrána nechala přes noc v chladu inkubovat s primárními protilátkami proti LC3-I/II, P-Akt nebo β-aktinu (použit jako referenční protein) naředěnými v mléce (ředění 1000x).

Další den byla membrána promyta v TBS s 0,1% Tweenem (2x rychle, poté 15 min na třepače, 2x 5 min na třepače). Sekundární protilátka (anti-králičí s navázanou křenovou peroxidázou) byla 2000x naředěna v mléce a 45 min inkubována s membránou na třepače při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace byla membrána 3x promyta v TBS s 0,1% Tweenem.

Detekce probíhala prostřednictvím kvantitativního chemiluminiscenčního substrátového kitu Western Bright Quantum obsahujícího dva detekční roztoky, které byly bezprostředně před použitím smíchány v poměru 1:1. Vzniklým roztokem byla pipetou pokryta analyzovaná membrána. Výrobci použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce VIII. K měření chemiluminiscence byl použit přístroj Alliance 4.7, UVITEC Cambridge. Intenzita jednotlivých bendů byla kvantifikována programem ImageJ.

Tab. VIII: Seznam chemikálií použitých při metodě western blot.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
Vzorkový pufr	Bio-Rad
Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
ELFO marker	Sigma-Aldrich
Tris	VWR Chemicals
Glycine	VWR Chemicals
Methanol	VWR Chemicals
TBS	VWR Chemicals
Tween	Sigma-Aldrich
Odtučněné mléko	Simandl
LC3-I/II protilátka	CellSignaling
P-Akt protilátka	CellSignaling
β -Aktin protilátka	CellSignaling
Anti-králičí HRP protilátka	CellSignaling
Kit WesternBright Quantum HRP substrate	Advansta

3.2.7 Array apoptotických proteinů

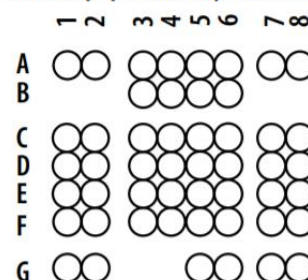
Při detekci apoptotických proteinů se pracovalo s lyzáty získanými podle kapitoly 3.2.5. Samotné array předcházelo stanovení množství totálního proteinu v jednotlivých lyzátech podle návodu v kitu Pierce BCA Protein Assay a sjednocení jejich koncentrace

přidáním RIPA pufru. K analýze apoptotických proteinů pak bylo použito 170 µl z každého lyzátu obsahujícího 90 µg totálního proteinu.

Samotná detekce se prováděla podle kitu Proteome Profiler – Mouse Apoptosis Array Kit, kdy je možné na jedné membráně detekovat hladinu 21 proteinů zapojených do dráhy apoptózy. Detekce proteinů probíhala pomocí kvantitativního chemiluminiscenčního substrátového kitu WesternBright Quantum obsahujícího detekční roztoky, které byly bezprostředně před použitím smíchány v poměru 1:1. Vzniklým roztokem byly pipetou pokryty analyzované membrány. Výrobci použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce IX. K měření chemiluminiscence byl použit přístroj Alliance 4.7, UVITEC Cambridge. Po přiřazení proteinů k výsledným spotům podle obrázku 6 byla intenzita signálu jednotlivých navázaných proteinů kvantifikována programem ImageJ.

Coordinate	Analyte
A1,2	Reference Spots
A3,4	Bad
A5,6	Bcl-2
A7,8	Reference Spots
B3,4	Bcl-x
B5,6	Caspase-3, cleaved
C1,2	Catalase
C3,4	Claspin
C5,6	Cytochrome c
C7,8	Fas/TNFRSF6/CD95
D1,2	HIF-1α
D3,4	HO-1/HMOX1/HSP32
D5,6	HO-2/HMOX2
D7,8	HSP27
E1,2	HSP60
E3,4	HSP70/HSPA1A
E5,6	MCL-1
E7,8	p27/Kip1
F1,2	p53
F3,4	SMAC/Diablo
F5,6	TNF R1/TNFRSF1A
F7,8	TRAIL R2/TNFRSF10B
G1,2	Reference Spots
G5,6	XIAP
G7,8	Negative Control

Mouse Apoptosis Array Coordinates



Obr. 6: Pozice navázaných protilátek na membráně kitu Proteome Profiler – Mouse Apoptosis Array.

Zdroj: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary031.pdf?v=20210316>

Tab. IX: Seznam použitých chemikálií při array apoptotických proteinů.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Scientific
RIPA pufr	Sigma-Aldrich
Proteome Profiler – Mouse Apoptosis Array Kit	R&D Systems
WesternBright Quantum HRP substrate	Advansta

3.2.8 Plaková titrace

Ke stanovení počtu virových částic ve vzorcích byla použita metoda plakové titrace. K této metodě se LC nebo pDC buňky nasadily do 96-jamkových panelů po 200 µl na jamku. V určených časových intervalech se panel s buňkami zabalil do parafilmu a uložil do mrazáku na -70 °C, nebo bylo odebráno pouze médium do mikrozkuvek a buňky byly využity k jinému experimentu.

Metoda byla nejprve prováděna s PS buňkami, později se přešlo na buňky A549. Buňky se uvolnily z kultivační lahve pomocí trypsinu a po spočítání v Bürkerově komůrce byly rozsuspendovány v médiu. V případě A549 buněk bylo použito DMEM médium (+ 10 % BOFES, ATB, glutamin). Výsledná koncentrace buněk byla $5 \cdot 10^5$ buněk/ml. Při použití PS buněk byly buňky rozsuspendovány v L15 médiu s 3 % PTS, ATB a glutaminem na koncentraci $3 \cdot 10^5$ buněk/ml.

Do jamek 24-jamkového panelu bylo napipetováno 180 µl média (kompletního DMEM nebo L15). Poté bylo do první jamky napipetováno 20 µl analyzovaného vzorku. Následovalo jeho ředění desítkovou řadou. Do každé jamky bylo přidáno 300 µl suspenze PS nebo A549 buněk. Panely byly zamíchány v horizontálním a vertikálním směru. Následně byly panely inkubovány v 0,5 % CO₂ při 37 °C.

Po 3-4 hodinách byly buňky převrstveny 400 µl pokrývky skládající se z CMC a 2x koncentrovaného L15 nebo DMEM v poměru 1:1. Buňky byly inkubovány 5 dní. Výrobci použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce X.

Po pěti dnech byly zviditelněny plaky. Nejprve byly panely promyty v 0,9% roztoku NaCl v destilované vodě. Následně byly panely ponechány 45 minut v naftalenové černi, čímž došlo ke vzniku neobarvených plaků (virem zlyzované buňky) mezi ostatními obarvenými buňkami. Plaky byly spočítány a převedeny na množství virových částic, které jsou schopny tvořit plaky

$$\text{(PFU/ml) pomocí vzorce PFU/ml} = \frac{\text{počet plaků} \times 10^{\text{ředění jamky}}}{0,2}$$

Tab. X: Seznam použitých chemikálií při plakové titraci.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
Leibovitz L15 médium	Biowest
PTS	Biowest
Antibiotika	Biosera
Glutamin	Biosera
DMEM médium	Biosera
BOFES	Biowest
CMC	Sigma-Aldrich
NaCl	Penta

3.2.9 Analýza apoptózy na průtokovém cytometru

Apoptóza v Langerhansových buňkách po infekci hyprem byla zkoumána sledováním pozitivitu buněk na aktivní kaspázu-3.

Z jamek 96-jamkového panelu bylo odebráno médium a buňky byly uvolněny 20minutovou inkubací s PBS + 0,5 mM EDTA na ledu, poté byly přeneseny do mikrozkušavek. Po stočení 3 minuty při 250 g a 4 °C se buňky 2x promyly ve FACS pufru. Jelikož se jednalo o nesortované buňky, byly kvůli fenotypizaci ve FACS pufru naznačeny protilátkou MHC II–AF700 (ředění 300x). Po naznačení se postupovalo podle pokynů v kitu FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit. Následně se vzorky měřily na cytometru BD FACSCanto™.

Apoptóza v plazmacytooidních buňkách se zjišťovala sledováním fluorescence značeného proteinu annexinu V, který je schopný vázat se na apoptotický marker fosfatidylserin. Analýza annexinu podle Annexin V Apoptosis Detection Kit APC nebo FITC se ve dvou případech doplnila ještě barvivy k rozlišení živých a mrtvých buněk, a to buď FVD-eFluor 80, nebo 7-AAD.

V případě značení FVD a annexinem byly buňky (posbírané z panelu silikonovou škrabkou) nejprve opláchnuty PBS a značeny barvivem FVD (ředění 200x) 30 minut ve tmě. Po 30 minutách byly buňky promyty „binding pufrem“ (BP) z kitu na Annexin V. Následovalo povrchové značení buněk koktejlem protilátek v BP obsahujícím CD11b-PerCP-Cy5.5 (ředění 100x) nebo -FITC (ředění 10x), CD11c-PE (ředění 100x), B220-PE-Cy7 (ředění 50x) a annexin V-APC (ředění 20x). Prostředí BP bylo velice důležité, neboť pro interakci annexinu s fosfatidylserinem je nezbytná přítomnost kalcia. Po promytí BP se buňky fixovaly přidáním 200 µl ROTI®Histofix 4 %, opět promyly a změřily na cytometru BD FACSCanto™ nebo

NovoCyte 3000 (ACEA). Barvivo 7-AAD se v případě potřeby přidalo k buňkám 5 minut před měřeními na cytometru v ředění 20x. Výrobci použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce XI.

Tab. XI: Seznam použitých chemikálií při přípravě buněk na analýzu apoptózy na průtokovém cytometru.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
EDTA	Sigma-Aldrich
FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD Pharmigen™
MHC II–AF700	eBioscience
Annexin V Apoptosis Detection Kit APC nebo FITC	eBioscience
CD11b-PerCP-Cy5.5	eBioscience
CD11b-FITC	Miltenyi Biotec
CD11c-PE	eBioscience
B220-PE-Cy7	Miltenyi Biotec
ROTI®Histofix	Roth
FVD	eBioscience
7-AAD	eBioscience

3.2.10 Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue

Buňky byly nasazeny v triplicátech do 96-jamkového panelu po 200 μ l na jamku. V určených časových intervalech bylo buňkám odebráno 100 μ l média a do jamek se zbylým médiem a buňkami byl napipetován alamarBlue Cell Viability Reagent (ředění 10x). Toto barvivo využívá schopnosti živých buněk redukovat modré barvivo resazurin na silně fluorescentní růžový resorufin. Výrobce použité chemikálie je uveden v tabulce XII. Takto připravený panel byl 3 hodiny ponechán ve tmě v termostatu s 5 % CO₂ na 37 °C.

Po 3 hodinách bylo médium přeneseno do jiného panelu, v němž byla na spektrometru BioTek Synergy H1 stanovena fluorescence (excitační vlnová délka: 550 nm, emisní vlnová délka: 590 nm). Z naměřené hodnoty fluorescence byl odečten blank (RPMI médium bez buněk) a hodnota nestimulovaných buněk byla považována za 100 %.

Tab. XII: Výrobce chemikálie použité k detekci přežívání buněk.

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
AlamarBlue Cell Viability Reagent	ThermoFisher

3.2.11 Statistické vyhodnocení dat

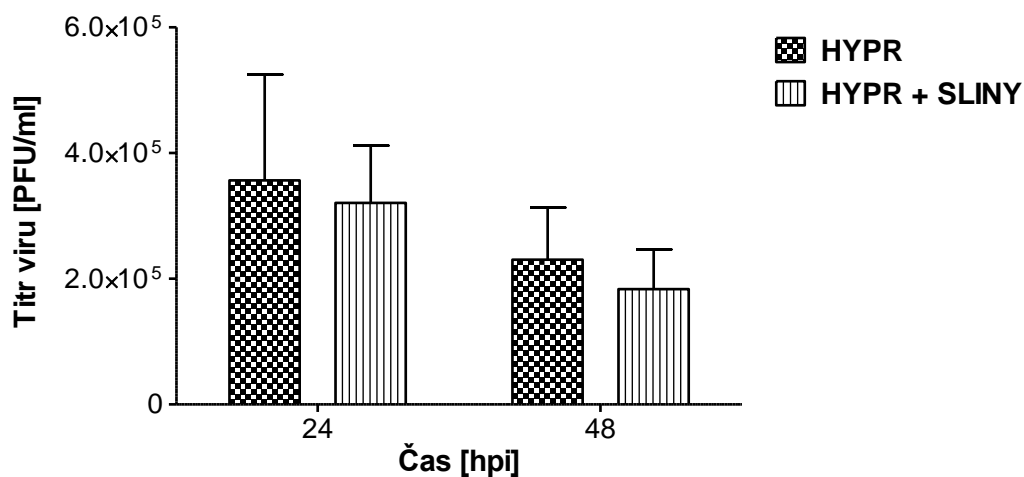
Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5 pomocí jednocestné nebo dvoucestné ANOVY. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro $p < 0,05$, dvě hvězdičky pro $p < 0,01$, tři hvězdičky pro $p < 0,001$). Všechny grafy ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry ze stanovených hodnot a chybové úsečky v grafech představují střední chybu průměru (SEM).

4 VÝSLEDKY

4.1 LANGERHANSOVY BUŇKY

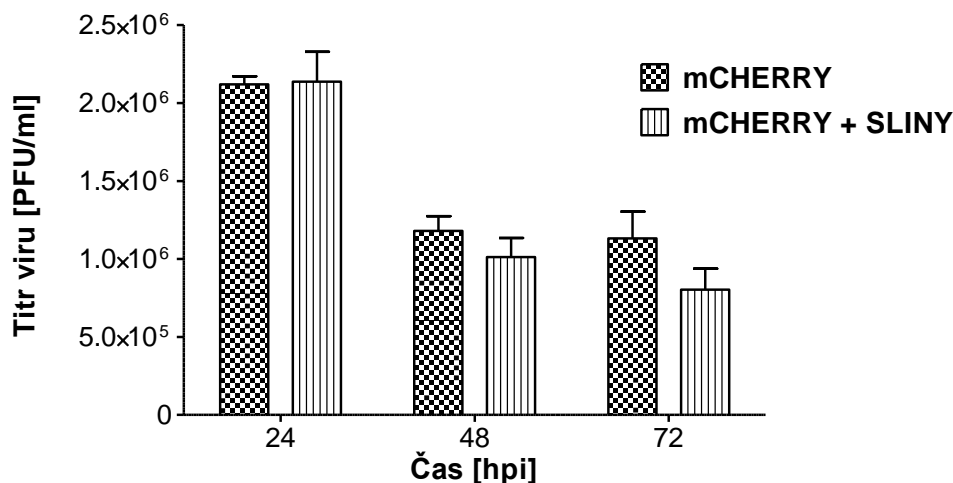
4.1.1 Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v LC

K detekci replikace viru TBE byly využity sortované Langerhansovy buňky. Buňky byly infikovány Hyprem (MOI 10) v přítomnosti klíštěcích slin ($10 \mu\text{g/ml}$). Připravené vzorky byly analyzovány metodou plakové titrace za použití PS buněk. Vliv klíštěcích slin na replikaci byl takto testován 2x, v obou případech v triplicátech. Výsledky experimentů jsou vidět na obrázku 7. V experimentech nedošlo k významnému ovlivnění titru viru.



Obr. 7: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru kmene Hypr v LC.

Stejný experiment byl zopakován s infekcí tentokrát nesortovaných Langerhansových buněk virem kmene Hypr označeným červeným fluorescenčním proteinem mCherry v množství MOI 5. Připravené vzorky byly analyzovány plakovou titrací za použití buněk A549. Takto bylo ovlivnění replikace viru testováno jednou, za použití triplicátů. Výsledky jsou vidět na obrázku 8. Ani v tomto případě klíštěcí sliny signifikantně neovlivnily replikaci viru.

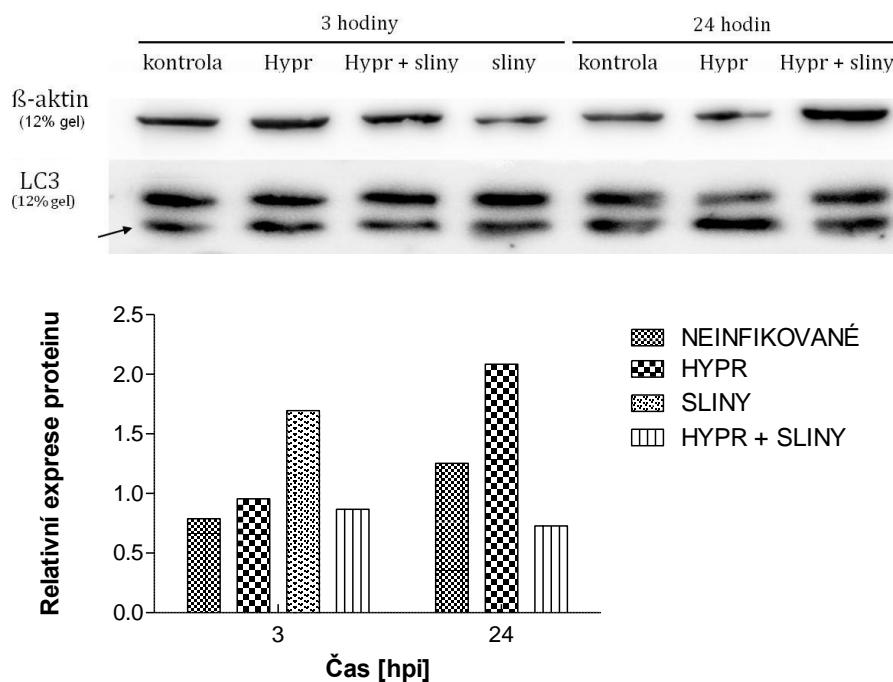


Obr. 8: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru mCherry v LC.

4.1.2 Vliv klíštěcích slin na proces autofágie ve virem infikovaných LC

Autofágie v sortovaných Langerhansových buňkách byla analyzována metodou western blot. Buňky byly infikovány Hyprem (MOI 10) v přítomnosti klíštěcích slin (10 µg/ml). Jako autofagický marker byl použit protein LC3, jehož cytosolická forma (LC3-I) se v průběhu autofágie lipidací přeměňuje na formu LC3-II. Přítomnost konvertované formy LC3-II v podobě spodního bendu tedy pozitivně koreluje s mírou autofágie. Jako referenční protein byl použit β-aktin, jehož exprese v buňkách zůstává konstantní. Relativní aktivita byla kvantifikována jako poměr hustoty pixelů LC3-II proteinu a β-aktinu.

Výsledky experimentu jsou vidět na obrázku 9. Na výsledcích je patrné, že v Langerhansových buňkách k autofágii dochází. Ačkoliv 3 hodiny po infekci byla autofágie slinami zvýšená, sliny neovlivnily autofágii ve virem infikovaných buňkách. V intervalu 24 hodin je viditelná indukce autofágie Hyprem a její inhibice slinami ve virem infikovaných buňkách. Tento experiment byl proveden jednou.



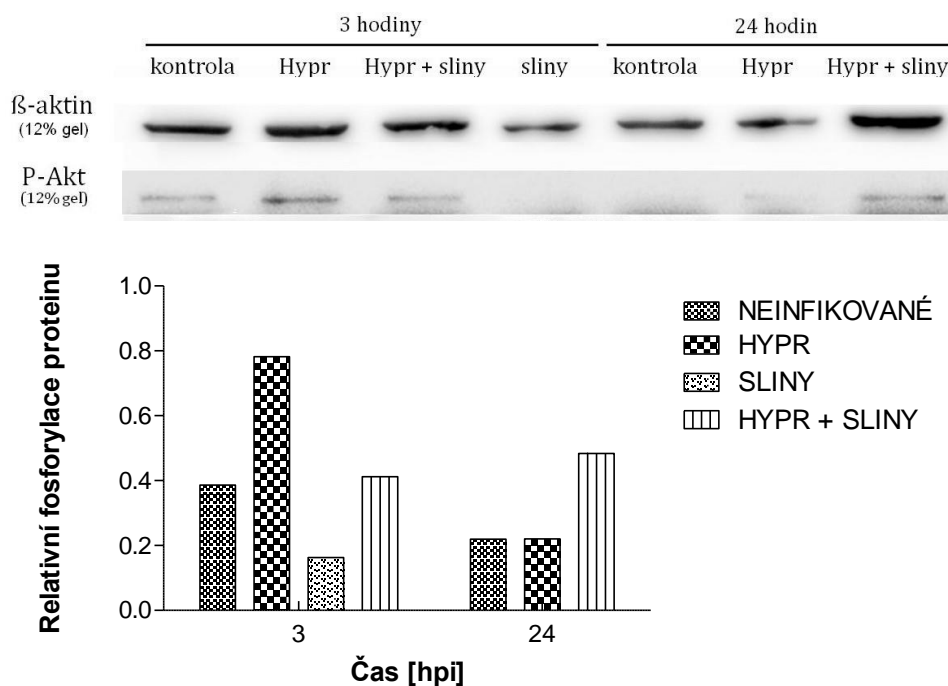
Obr. 9: Vliv virové infekce a klišťecích slin na relativní expresi proteinu LC3-II v LC.

4.1.3 Vliv klišťecích slin na proces apoptózy ve virem infikovaných LC

Apoptóza byla v Langerhansových buňkách analyzována detekováním fosforylované Akt (P-Akt) metodou western blot a značením buněk protilátkami proti kaspáze-3 a následnou detekcí na cytometru.

K detekci P-Akt, která byla provedena jednou, byly použity sortované Langerhansovy buňky infikované Hyprem (MOI 10) a inkubované se slinami (10 μ g/ml). Akt je serin/threoninová kináza s protiapoptotickou aktivitou, která je fosforylovaná po aktivaci PI3K. Tím se z Akt stává aktivní P-Akt, která následnou fosforylací dalších proteinů ovlivňuje přežití buňky. Může například fosforylovat Bad a tím blokovat jeho proapoptotickou aktivitu nebo fosforylací kaspázy-9 snížit její proteázovou aktivitu (Cross et al., 2000). Jako referenční protein byl použit β -aktin, jehož exprese v buňkách zůstává konstantní. Relativní exprese byla kvantifikována jako poměr hustoty pixelů P-Akt proteinu a β -aktinu.

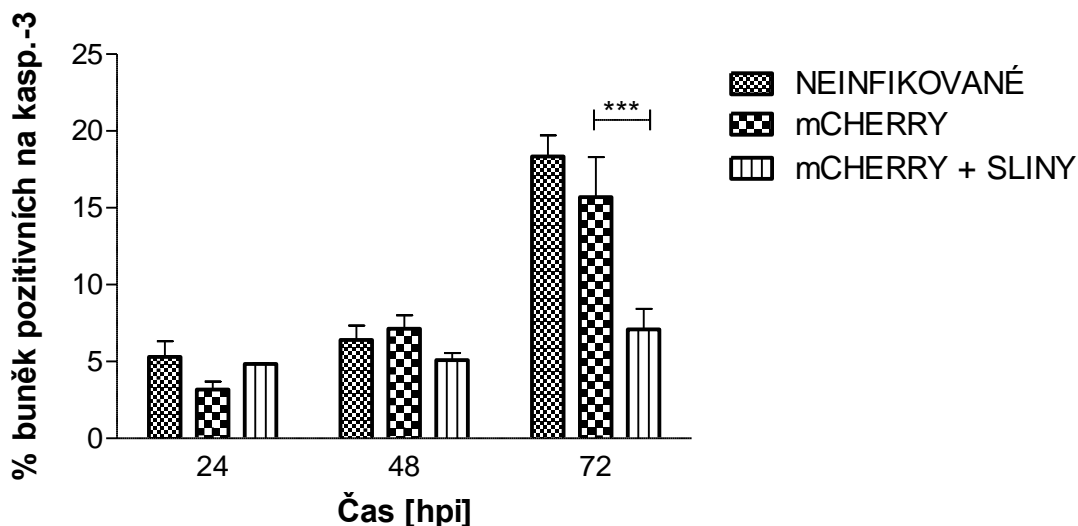
Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 10. Můžeme vidět, že se v prvním časovém intervalu (3 hpi) ve virem infikovaných buňkách exprese P-Akt zvýšila. V buňkách infikovaných za přítomnosti slin zůstala exprese P-Akt na úrovni kontroly. Po 24 hodinách od infekce naopak nedošlo k ovlivnění hladiny P-Akt samotným Hyprem, kdežto infekce se slinami vyvolala její mírný nárůst.



Obr. 10: Vliv virové infekce a slin na fosforylaci Akt v LC.

K detekci kaspázy-3, byly použity nesortované triplikáty Langerhansových buněk infikovaných mCherry (MOI 5) a inkubovaných se slinami (10 $\mu\text{g/ml}$). Procento apoptotických buněk (tzn. buněk pozitivních na kaspázu-3) bylo stanoveno v populaci MHC II pozitivních buněk. Tato analýza byla provedena jednou.

Na obrázku 11 můžeme vidět, že v čase 24 a 48 hodin po infekci bylo na kaspázu-3 pozitivní pouze velmi malé procento buněk a nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi neinfikovanými, infikovanými buňkami a buňkami infikovanými za přítomnosti slin. Po 72 hodinách se procento buněk pozitivních na kaspázu-3 v neinfikovaných i infikovaných buňkách zvýšilo, zatímco za přítomnosti slin byl počet apoptotických buněk signifikantně nižší.

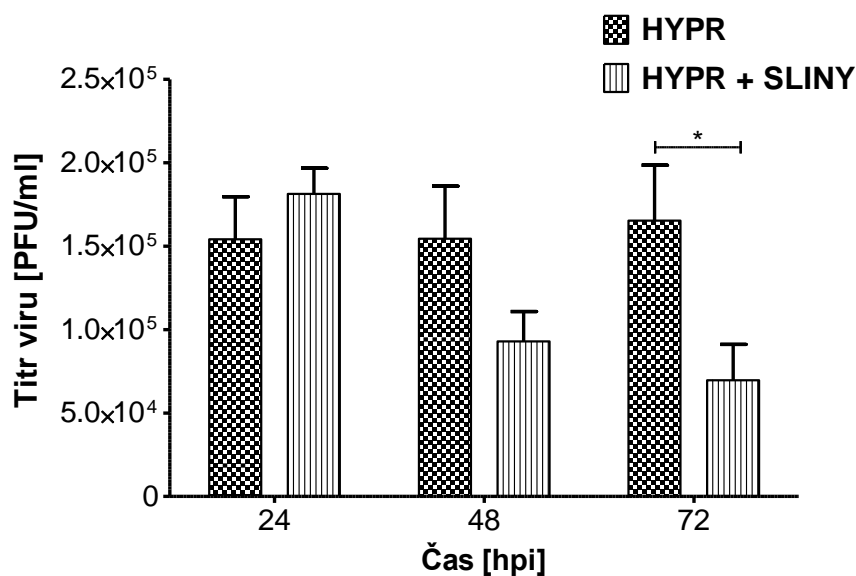


Obr. 11: Vliv slin a virové infekce na expresi kaspázy-3 v LC.

4.2 PLAZMACYTOIDNÍ DENDRITICKÉ BUŇKY

4.2.1 Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v pDC

K detekci replikace viru TBE byly využity plazmacytoidní buňky. Buňky byly infikovány Hyprem (MOI 5) v přítomnosti klíštěcích slin (10 µg/ml). Přípravené vzorky byly analyzovány metodou plakové titrace za použití buněk A549. Vliv klíštěcích slin na replikaci byl takto testován 2x, v obou případech v triplicátech. Výsledky jsou vidět na obrázku 12. Zatímco 24 ani 48 hodin po infekci nebyla replikace viru slinami významně ovlivněná, v časovém intervalu 72 hodin po infekci došlo ve vzorku se slinami ke statisticky významnému poklesu titru viru o téměř 58 %.

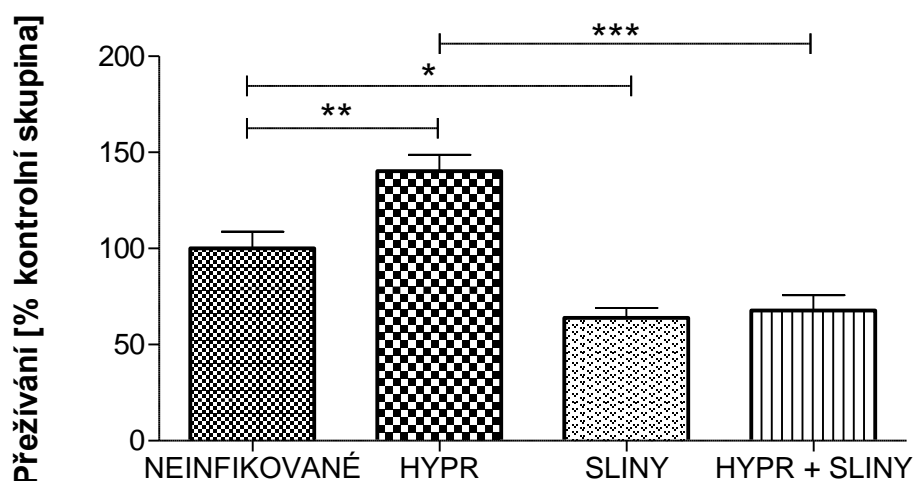


Obr. 12: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru v pDC.

4.2.2 Vliv klíčtčích slin na přežívání buněk ve virem infikovaných pDC

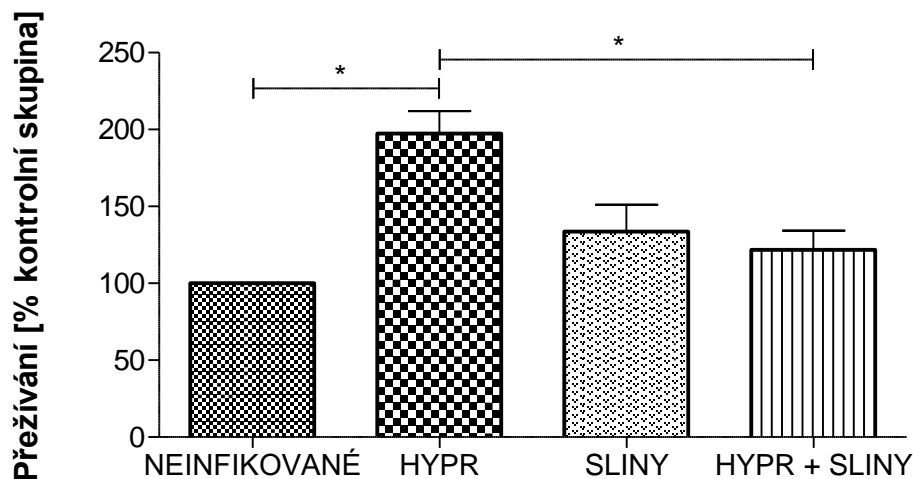
Analýza přežívání plazmacytoïdních buněk byla provedena pomocí barviva alamarBlue, které využívá metabolické aktivity živých buněk. Část buněk byla infikována Hyprem (MOI 5) a inkubována se slinami (10 µg/ml).

V časovém intervalu 24 hodin byl experiment proveden 3x, ve všech případech v triplicátech. Výsledky jsou vidět na obrázku 13. Infekce Hyprem způsobila statisticky významný nárůst přežívání buněk, zatímco inkubace se slinami zapříčinila oproti neinfikované kontrole významný pokles. Přítomnost slin v infikovaných buňkách vyvolala statisticky významný pokles v přežívání buněk v porovnání s těmi, které byly infikovány bez přítomnosti slin, a to o 52 %. Přežívání buněk infikovaných se slinami a buněk, ve kterých byly přítomny jen sliny bez viru, se nelišilo.

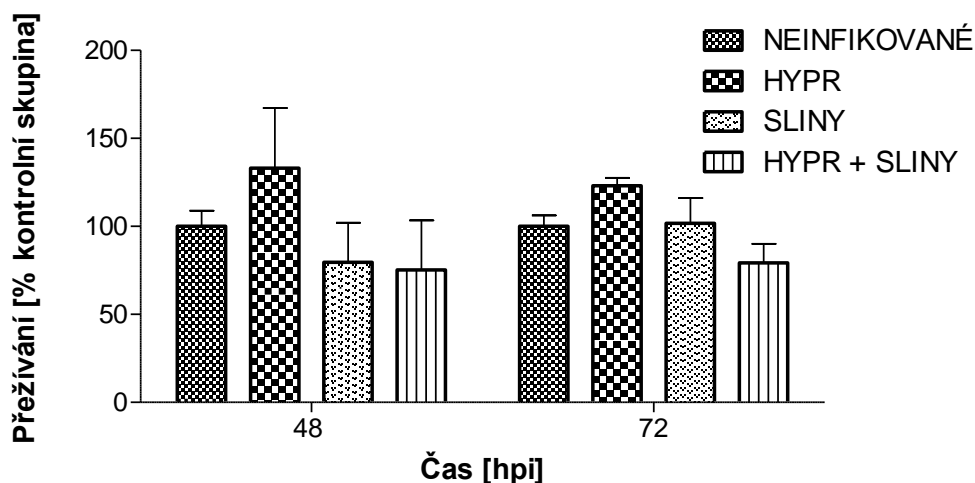


Obr. 13: Přežívání plazmacytoïdních buněk v závislosti na přítomnosti slin a virové infekce 24 hodin po infekci. Jako 100 % byla zvolena průměrná hodnota neinfikované skupiny.

Experiment byl proveden i jiných časových intervalech – konkrétně jednou v duplikátech v čase 16 hpi, a jednou v triplicátech 48 hpi a 72 hpi. Na obrázku 14 vidíme výsledky 16 hodin po infekci. Je patrné, že i v tomto případě je viabilita buněk signifikantně zvýšena infekcí Hyprem. Přítomnost slin přežívání infikovaných buněk signifikantně snížila. Po 48 a 72 hodinách po infekci (obrázek 15) sice vlivem slin nedošlo k signifikantnímu ovlivnění přežívání buněk, nicméně trendové snížení je stále patrné.



Obr. 14: Přežívání plazmacytoidních buněk v závislosti na přítomnosti slin a virové infekce 16 hodin po infekci. Jako 100 % byla zvolena průměrná hodnota neinfikované skupiny.



Obr. 15: Přežívání plazmacytoidních buněk v závislosti na přítomnosti slin a virové infekce 48 a 72 hodin po infekci. Jako 100 % byla zvolena průměrná hodnota neinfikované skupiny.

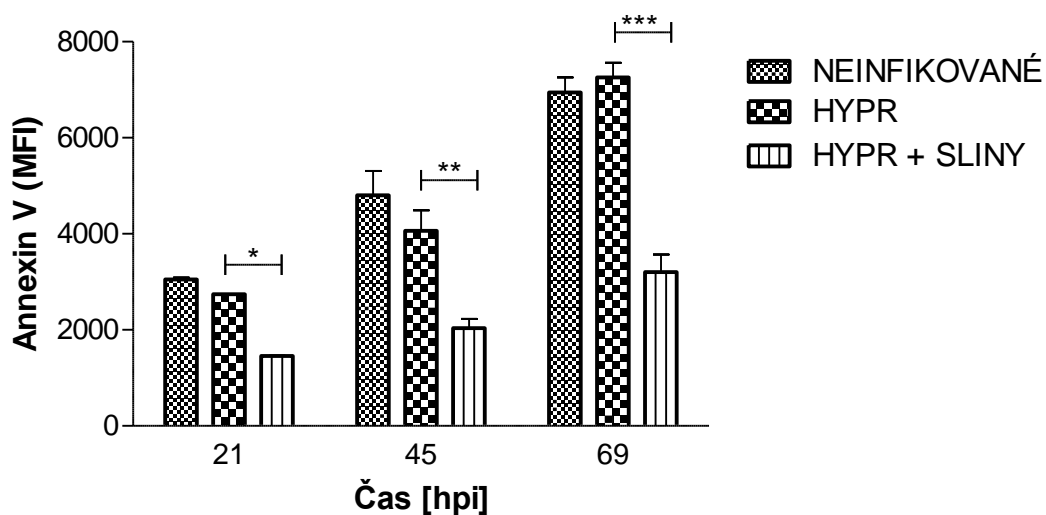
4.2.3 Vliv klíčtějších slin na proces apoptózy ve virem infikovaných pDC

Apoptóza byla v plazmacytoidních buňkách analyzována na průtokovém cytometru. Gatovací strategie byla následující – nejprve se ohraničily singlety, z nichž byly vybrány buňky pozitivní na marker CD11c. Z této populace byly vybrány jako pDC ty buňky, které byly pozitivní na B220 a zároveň negativní na CD11b. V průměru ze všech experimentů bylo považováno za populaci pDC 39 % z vyderivovaných buněk.

Samotná analýza apoptózy byla provedena pomocí kitu, který umožňuje detekci externalizovaného fosfatidylserinu, na který se váže Annexin V. Analýza byla provedena

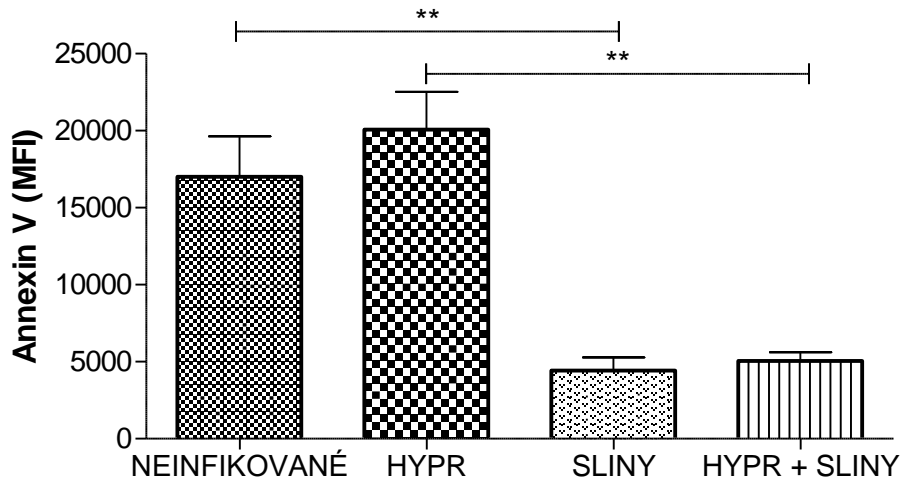
celkem 3x, v různých časových intervalech. Část buněk byla před analýzou infikována Hyprem (MOI 5) a inkubována se slinami (10 µg/ml). Na rozlišení pozdně apoptotických, respektive nekrotických, buněk byly použity fluorescenční barvičky FVD nebo 7-AAD. Jelikož se však většina buněk jevila jako nekrotická (bez rozdílu mezi skupinami), přisoudily jsme tento fakt časově a procesně náročné manipulaci se vzorky a v rámci analyzování výsledků se přistoupilo k vyhodnocování annexinu samotného.

V prvním experimentu byla detekovaná vazba annexinu po 21, 45 a 69 hodinách infekce. K experimentu byly použity duplikáty. Na obrázku 16 vidíme výsledky. Byl pozorován pokles průměrné fluorescence, a tím i externalizovaného fosfatidylserinu, ve skupině buněk se slinami, a to ve všech časových intervalech v průměru o 50 %.

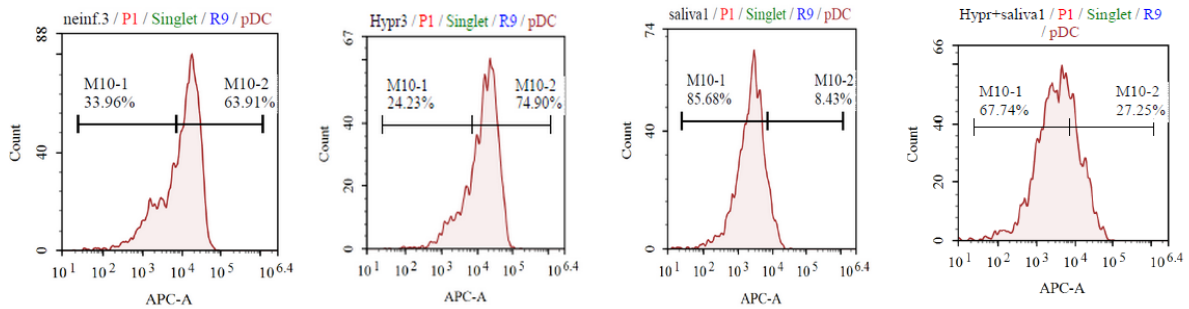


Obr. 16: Vliv klíštěcích slin a virové infekce na fosfatidylserin na povrchu pDC 21, 45 a 69 hodin od infekce. MFI – *median fluorescence intensity* – střední hodnota fluorescence.

Na obrázku 17 můžeme vidět výsledek experimentu v nejčasnějším časovém intervalu 14 hodin po infekci. Tento experiment byl děláný v triplicátech. Sliny signifikantně snížily expresi fosfatidylserinu ve virem infikovaných buňkách o téměř 75 %. Na obrázku 18 je ukázáno porovnání histogramů tohoto experimentu.

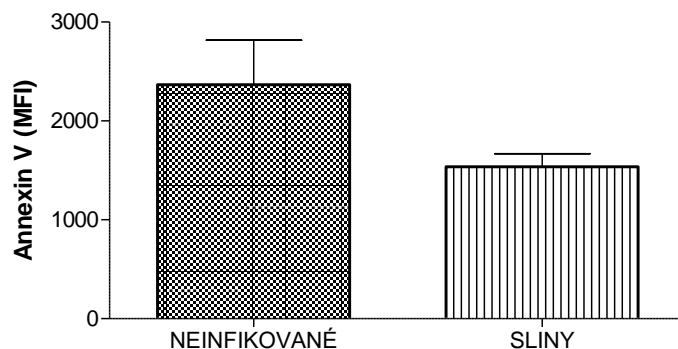


Obr. 17: Vliv klíštěcích slin a virové infekce na fosfatidylserin na povrchu pDC 14 hodin od infekce. MFI – *median fluorescence intensity* – střední hodnota fluorescence.



Obr. 18: Vliv klíštěcích slin a virové infekce na fosfatidylserin na povrchu pDC 14 hodin od infekce. Ukázka histogramů. Zleva doprava: buňky neinfikované – infikované Hyprem – se slinami – infikované Hyprem za přítomnosti slin.

Pro konfirmaci snížení fosfatidylserinu na buňkách vlivem slin byl experiment v časovém intervalu 16 hodin proveden jen s buňkami bez infekce a s buňkami se slinami (obrázek 19). Ačkoliv nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění, opět bylo za přítomnosti slin pozorováno snížení fosfatidylserinu na povrchu buněk.



Obr. 19: Vliv klišťecích slin na fosfatidylserin na povrchu pDC po 16 hodinách.

MFI – *median fluorescence intensity* – střední hodnota fluorescence.

4.2.4 Vliv klišťecích slin na expresi apoptotických proteinů ve virem infikovaných pDC

Array byla provedena podle kitu, v němž byly na membránu navázány protilátky proti 21 proteinům zapojených do drah apoptózy.

Jednou skupinou analyzovaných proteinů byly transmembránové receptory, tzv. receptory smrti. Mezi ty patří Fas/CD95, TNF RI, a TRAIL R2 (Elkon, 2013).

Další testovanou kategorií jsou členové Bcl-2 rodiny, a to jak proapoptotické proteiny (Bad), tak ty antiapoptotické (Bcl-2, BCL-X, MCL-1) (Elkon, 2013).

Protein p53 má proapoptotické funkce, neboť indukuje apoptózu v případě závažného poškození DNA a pod vlivem stresu vstupuje do mitochondrie, kde aktivuje expresi proapoptotických genů a supresi genů protiapoptotických (Wawryk-Gawda et al., 2014).

Skupina heat shock proteinů (HSP27, HSP60, HSP70) se akumuluje v buňce, která je vystavena teplu a jiným stresovým stimulům. Fungují jako molekulární chaperony, které umožňují buňce se na takové prostředí adaptovat se a přežít tak i v jinak letálních podmínkách. Zatímco HSP60 je protein proapoptotický a je v buňce exprimován konstitutivně, HSP27 a HSP70 jsou indukovány stresovými stimuly a fungují jako proteiny antiapoptotické (Garrido et al., 2001).

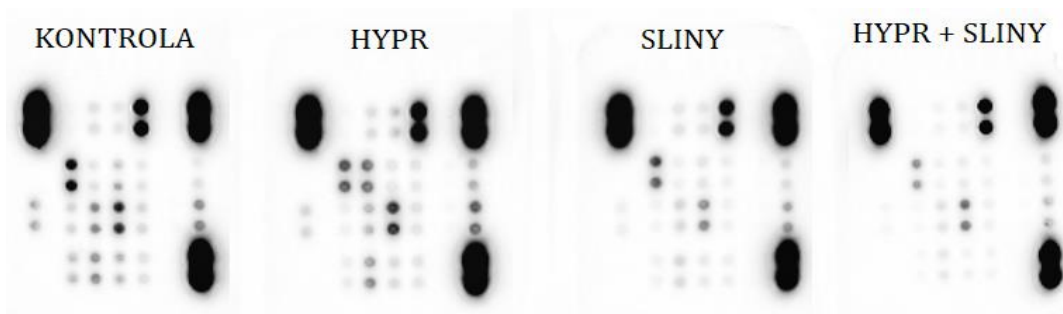
Kataláza je buněčný enzym, který se vyskytuje ve všech aerobních buňkách s cytochromovým systémem. Hlavní funkcí je rozklad peroxidu vodíku a recyklace kyslíku, který může být v metabolismu znovu využit (Deisseroth and Dounce, 1970). Mezi antioxidanty patří také proteiny HO-1 a HO-2, které chrání buňky před oxidačním stresem (Choi and Alam, 1996; Intagliata et al., 2019).

Claspin funguje jako brzda proti apoptóze. Když je DNA příliš poškozená a nemůže být opravena, tato brzda je odstraněna prostřednictvím štěpení claspinu kaspázou -3 nebo -7 a degradace v proteazomu (Semple et al., 2007).

HIF-1a je klíčovým regulátorem apoptózy indukované hypoxií. Dokáže apoptózu jak indukovat, tak inhibovat (Greijer and Van Der Wall, 2004). Dvojakou funkci může mít i protein p27, který na jednu stranu hraje důležitou roli v regulaci progresu buňky z G1 fáze do S fáze, ale vysoké hladiny p27 dokážou také indukovat apoptózu (Wang et al., 1997).

XIAP patří do proteinové rodiny intracelulárních inhibitorů apoptózy (IAPs). XIAP je funkčně propojen s antiapoptotickým proteinem P-Akt (Kirsch et al., 2020), inhibuje efektorové kaspázy (zejména kaspázu-9) a sám může být inhibovaný proteinem SMAC/Diablo, který je uvolňován do cytosolu během apoptózy (Elkon, 2013).

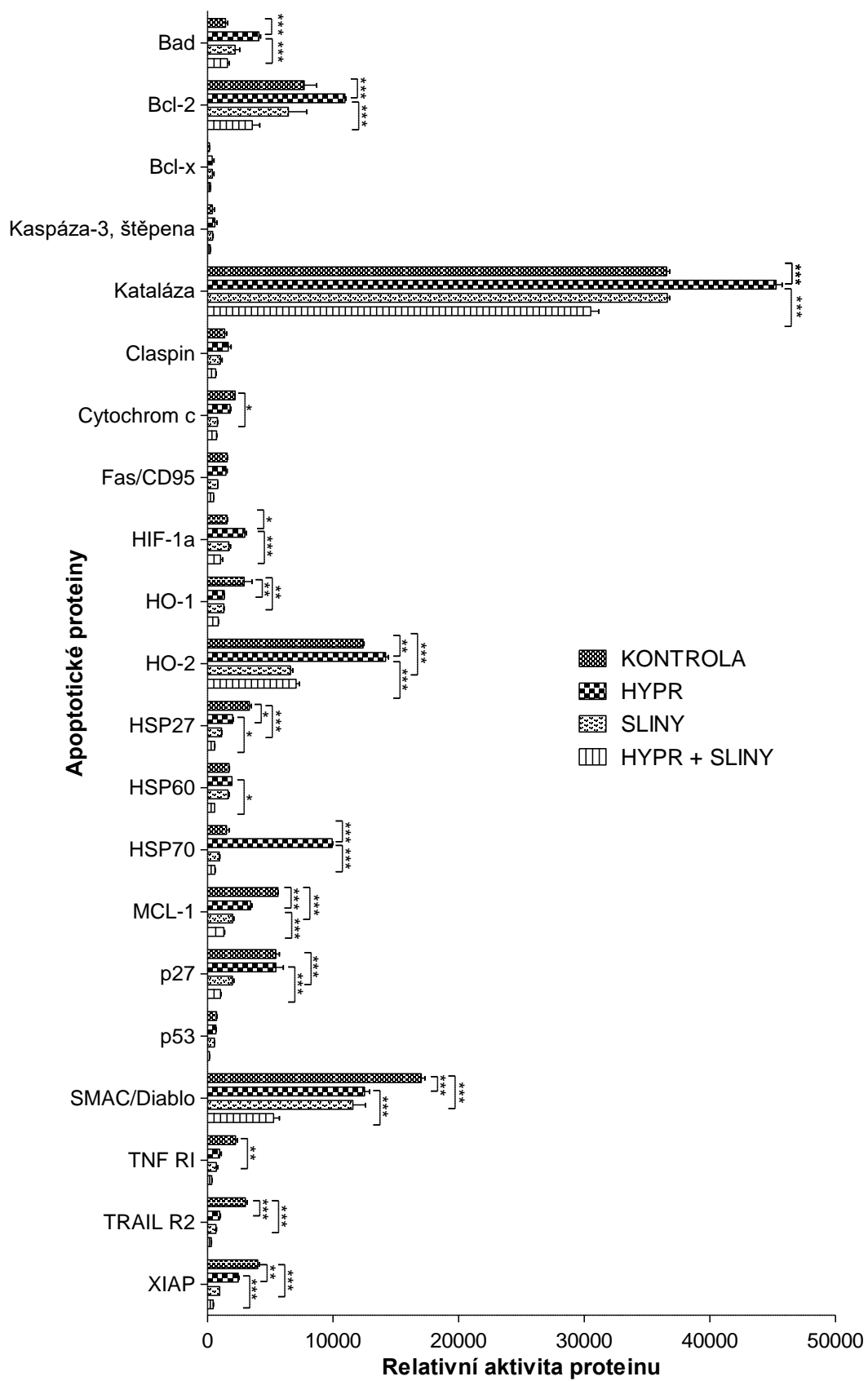
Array byla provedena na lyzátech plazmacytoidních buněk, z nichž některé buňky byly infikovány Hyprem (MOI 5) a inkubovány se slinami (10 µg/ml). Lyzáty byly připraveny po 24 hodinách infekce. Na obrázku 20 můžeme vidět výslednou podobnou array po změření chemiluminiscence na přístroji Alliance 4.7, UVITEC Cambridge. Tento experiment byl proveden jednou.



Obr. 20: Porovnání array apoptotických proteinů v plazmacytoidních buňkách 24 hodin po infekci virem kmene Hypr za přítomnosti klišťecích slin.

Po přiřazení spotů k navázaným protilátkám proti jednotlivým proteinům byl vytvořen graf. Na obrázku 21 můžeme vidět různou expresi 21 apoptotických proteinů v závislosti na infekci buněk a přítomnosti slin.

Můžeme vidět, že v 6 případech – jmenovitě Bad, Bcl-2, kataláza, HIF-1a, HO-2, HSP70 - došlo ke statisticky významnému zvýšení aktivity proteinu v buňkách infikovaných Hyprem ve srovnání s neinfikovanou skupinou. U všech těchto proteinů zároveň došlo k jejich staticky významnému snížení v infikovaných buňkách vlivem slin. U Bad se exprese ve virem



Obr. 21: Expresie apoptotických proteinů v plasmacytoidních buňkách v intervalu 24 hodin od infekce Hyprem.

infikovaných buňkách se slinami snížila oproti infikovaným buňkám bez slin o 62 %, u Bcl-2 o 67 % u katalázy o 33 %, u HIF-1a o 65 %, u HO-2 o 50 %, a u HSP70 dokonce o 94 %.

V případě dalších 6 proteinů (HO-1, HSP27, MCL-1, SMAC/Diablo, TRAIL R2, XIAP) došlo po infekci buněk Hyprem k signifikantnímu snížení exprese proteinu ve srovnání s neinfikovanými buňkami. Ve všech těchto případech současně docházelo ke snížení exprese tohoto proteinu i v buňkách se samotnými slinami. Proteiny HSP27, MCL-1, SMAC/Diablo a XIAP ještě navíc vykazovaly sníženou expresi v infikovaných buňkách se slinami. V případě HSP27 se exprese snížila o 71 %, u MCL-1 o 62 %, u SMAC/Diablo o 57 % a u XIAP o 82 %.

Celkem bylo tedy signifikantní ovlivnění exprese proteinu slinami v případě infikovaných buněk pozorováno u 12 proteinů z celkových 21. Jmenovitě se jednalo o proteiny Bad (o 62 %), Bcl-2 (o 67 %), kataláza (o 33 %), HIF-1a (o 65 %), HO-2 (o 50 %), HSP27 (o 71 %), HSP60 (o 71 %), HSP70 (o 94 %), MCL-1 (62 %), p27 (o 81 %), SMAC/Diablo (o 57 %) a XIAP (82 %).

Klíšťová encefalitida je virus z rodu *Flavivirus*. O tomto rodu je známo, že v buňkách, které infikuje, má vliv na proces apoptózy a autofágie (Iranpour et al., 2016; Okamoto et al., 2017) a zároveň ovlivňuje funkci dendritických buněk (Fialová et al., 2010; Libraty et al., 2001; Palmer et al., 2005; Robertson et al., 2009; Silva et al., 2007). Jelikož i o klíštěcích slinách je známo, že modulují hemostatický a imunitní systém člověka, včetně dendritických buněk (Kazimírová and Štibrániová, 2013; Kotál et al., 2015), je na místě se ptát, zda klíštěcí sliny, prostřednictvím kterých je TBEV přenášen, ovlivňují proces apoptózy a autofágie v dendritických buňkách infikovaných flaviviry. V minulosti už bylo ovlivnění apoptózy klíštěcími slinami zkoumáno v myeloidních dendritických buňkách (Lieskovská et al., 2018). Dendritické buňky však jsou heterogenní skupinou buněk a nelze automaticky předpokládat, že závěry učiněné z jedné populace platí i pro populaci druhou. Proto se tato práce zaměřuje na dvě konkrétní skupiny – Langerhansovy buňky a plazmacytoidní dendritické buňky.

Jako první bylo zkoumáno, zda klíštěcí sliny ovlivňují v LC a pDC replikaci viru. Jelikož jsou Langerhansovy buňky prvními buňkami, ve kterých se virus klíšťové encefalitidy replikuje, čímž se zásadně podílejí na jeho transportu do uzlin, bylo u nich očekáváno zvýšení titru viru za přítomnosti slin. Nahrávaly tomu i doposud provedené studie. V experimentu s mDC, které byly derivovány z kostní dřeně pomocí růstového faktoru GM-CSF, vedla přítomnost slin klíštěte *Ixodes ricinus* ke zvýšení replikace viru (Lieskovská et al., 2018). Ke stejnému výsledku dospěla také práce, která zkoumala replikaci viru vezikulární stomatitidy a její ovlivnění slinami klíšťat *Dermacentor reticulatus* a *Rhipicephalus appendiculatus* (Hajnická et al., 1998). U jiného flaviviru – viru západonilské horečky – měly komáří sliny taktéž pozitivní účinek na replikaci viru, tentokrát *in vivo* (Styer et al., 2011). V mé práci však byly výsledky odlišné. V případě LC nenastalo signifikantní ovlivnění virového titru slinami ani v jednom z časových intervalů. Replikace viru v pDC zůstala v časovém intervalu 24 hodin neovlivněná. 48 hodin po infekci byl pozorován pokles virového titru, který však nebyl statisticky významný. Až v časovém intervalu 72 hodin po infekci titr viru vlivem slin výrazně poklesl o téměř 58 %. Replikace viru vyžaduje sofistikovanou manipulaci buněčných procesů, která by měla vést k rovnováze mezi přežitím hostitelské buňky a efektivní replikací viru. Mezi procesy, které se na vytvoření takovéto rovnováhy podílejí a jsou tak flaviviry ovlivňovány, patří například správné modifikace proteinů, jejich degradace a skládání za účasti chaperonů. Dále také metabolismus lipidů, transport mezi cytoplazmou a jádrem nebo

funkce cytoskeletu a mitochondrií (Neufeldt et al., 2018). Není proto překvapivé, že sliny mohou ovlivňovat replikaci viru v různých buněčných subtypech jiným způsobem, neboť i dílčí články buněčných drah, na kterých úspěšná replikace viru závisí, mohou být pro daný subtyp specifické.

V další části mé práce byl proveden screening autofagických a apoptotických procesů v Langerhansových buňkách. Autofágie některé flaviviry využívají pro zefektivnění své replikace (Lee et al., 2008). Platí to i pro TBEV v primárních neuronech, ve kterých stimulace autofágie pozitivně ovlivnila replikaci viru (Bílý et al., 2015). Pozitivní vliv slin vektora na autofágii byl v minulosti například pozorován ve studii s proteinem přítomným ve slinách komára *Aedes aegypti*, který v monocytární linii imunitních buněk (dendritické buňky a makrofágy derivované z monocytů) autofágii aktivoval a podporoval tak replikaci virů dengue a Zika (Sun et al., 2020). V našem experimentu po 24 hodinách od infekce došlo v TBEV infikovaných buňkách k indukci autofágie, která byla vlivem slin ve virem infikovaných buňkách snížena. Jelikož i v dalších experimentech provedených v laboratořích Katedry medicínské biologie, kdy se sledovala autofágie v mDC a makrofázích PMJ2-R za pomoci markeru LC3, došlo k poklesu autofagického procesu vlivem slin (nepublikovaná data), nebyl tento výsledek tolik překvapivý. Vliv slin na autofágii v infikovaných LC byl v této práci sledován pouze jednou. Vzhledem k tomu by pro potvrzení inhibičního efektu slin bylo žádoucí experiment zopakovat a prozkoumat, jak indukce autofágie Hyprem ovlivňuje virovou replikaci v LC.

Viry často inhibují apoptózu, aby tak prodloužily životnost buňky, v které se replikují (Okamoto et al., 2017). Jednou ze strategií ovlivnění apoptózy je dráha PI3K/Akt (Diehl and Schaal, 2013), jejíž součástí je vznik fosforylované formy Akt s protiapoptotickou funkcí. V minulosti se ovlivnění dráhy PI3K/Akt ve prospěch přežití buňky ukázalo například u virů JEV, WNV a DENV (Lee et al., 2005; Urbanowski and Hobman, 2013). V našem experimentu 3 hodiny po infekci došlo k upregulaci fosforylované formy Akt infekcí Hyprem, což je v souladu se zmíněnými experimenty. Vlivem slin však došlo k jejímu snížení na úroveň kontroly. Toto dočasné snížení fosforylace Akt slinami bylo pozorováno i v mDC (Lieskovská et al., 2018) a pravděpodobně souvisí s částečnou ztrátou adherence. V intervalu 24 hodin byl taktéž pozorován výsledek obdobný práci Lieskovská et al., 2018 s mDC. Sliny v tomto čase zapříčinily v infikovaných buňkách zvýšení relativní exprese P-Akt, zatímco samotná infekce upregulaci nezapříčinila.

Při sledování apoptózy pomocí kaspázy-3 bylo v časových intervalech 24 a 48 hodin apoptotické jen velmi malé procento buněk. Po 72 hodinách od infekce došlo vlivem slin

k inhibici apoptózy ve virem infikovaných buňkách. Tento výsledek se taktéž shoduje se závěry práce s mDC Lieskovská et al., 2018. Zdá se tedy, že apoptóza je v infikovaných LC slinami snižována, ale jelikož byl očekávaný výsledek pozorován v pozdějších intervalech, než tomu bylo v mDC, v buněčných subtypech může docházet k odlišné kinetice apoptotického procesu. V naší práci ale nedošlo k podpoření replikace viru slinami. Inhibice apoptózy tedy pravděpodobně na replikaci TBEV v LC nemá vliv. Sledování apoptózy v LC bylo pojato jako screening pro další zkoumání, proto je potřeba experimenty zopakovat a ověřit tak dosavadní výsledky.

Analýza apoptózy v pDC byla provedena pomocí Annexinu V. Annexin V se váže na fosfatidylserin, který se při započetí apoptózy externalizuje na vnější stranu membrány. K vazbě Annexinu V může ale dojít i u buněk nekrotických, kdy se barvivo v důsledku prasknutí buňky váže na fosfatidylserin na vnitřní straně membrány. Z tohoto důvodu se sledování apoptózy prostřednictvím Annexinu V standardně provádí za současného použití fluorescenční barvičky, která rozliší nekrotické buňky. Annexin V se pak vyhodnocuje jen v buňkách, které nekrotické nejsou. Už během derivace pDC se ukázalo, že tento typ buněk je velmi citlivý, neboť se nedařilo získat takové množství buněk, jaké se očekávalo. Před značením buněk na cytometr se adherované buňky sundávaly z panelu silikonovou škrabkou a samotné značení doprovázelo několik centrifugací a promývání. Z těchto důvodů pravděpodobně došlo k poškození buněk během procesu a na cytometru se většina buněk jevila jako nekrotická. Poškození během procesu nahrává i fakt, že analýza přežívání buněk pomocí alamarBlue, která je procesně jednodušší, ukázala buňky živé. Názorně je to vidět na sledování přežívání po 16 hodinách a značení Annexinem V po 14 hodinách. Na tyto dvě analýzy byly na panely nasazené buňky derivované a infikované najednou, jedná se tedy o buňky pocházející z jednoho experimentu. Co je zajímavé, přestože v poměru mrtvých a živých buněk nebyl na cytometru mezi skupinami rozdíl, vlivem slin vždy došlo ke snížení střední intenzity fluorescence Annexinu V. Proto se přistoupilo k vyhodnocování Annexinu V ve všech buňkách bez ohledu na standardní protokol, ve kterém se z analýzy vyloučí buňky nekrotické. Pokud by externalizace fosfatidylserinu opravdu reflektovala proces buněčné smrti, tento výsledek by se projevil i na přežívání buněk, kdy by buňky s nižší střední hodnotou intenzity fluorescence Annexinu V (tj. buňky neapoptotické) vykazovaly vyšší přežívání. V našich výsledcích však došlo k překvapivému paradoxu. Vlivem klíštěcích slin docházelo k významně horšímu přežívání buněk, přestože vazba Annexinu V na fosfatidylserin byla nižší. Ke snížení fosfatidylserinu v pDC vlivem slin patrně dochází z jiného důvodu než jako důsledek inhibice apoptózy. Jak se v minulosti ukázalo, vždy totiž fosfatidylserin s apoptózou

souviset nemusí (Birge et al., 2016). Ačkoliv je externalizace fosfatidylserinu klasickým „eat-me“ signálem označujícím buňky k apoptóze, může být externalizován i na žijících monocyttech (Appelt et al., 2005), na povrchu zralých makrofágů (Callahan et al., 2000), aktivovaných B-lymfocytů (Dillon et al., 2000) a rakovinných buněk (Utsugi et al., 1991). Některé viry včetně DENV dokonce koncentrují fosfatidylserin na svém povrchu a využívají ho k vazbě a vstupu do buňky (Amara and Mercer, 2015; Birge et al., 2016). Důvodů, proč docházelo k odlišné vazbě Annexinu V na fosfatidylserin v buňkách inkubovaných se slinami, může být několik. Spekulovat můžeme o inhibici enzymů, které jsou za externalizaci zodpovědné, jako např. flipázy a flopázy. Toto by mohlo být zajímavé v souvislosti se skutečností, že stejné enzymy se podílejí na tvorbě extracelulárních vezikulů. Ovšem přítomnost fosfatidylserin-vázacího ligandu ve slinách je rovněž teoreticky možná. Na objasnění tohoto pozorování jsou proto nutné další experimenty.

Jestli buňka přežije nebo vstoupí do apoptózy závisí na vzájemné interakci proapoptotických a antiapoptotických proteinů. Přežívání plazmacytoidních dendritických buněk je na rozdíl od konvenčních DC závislé na proteinu Bcl-2. Pro obě populace je zároveň nezbytný i protein MCL-1 (Carrington et al., 2015). O proteinu MCL-1 je známo, že flaviviry inhibují jeho expresi (Suzuki et al., 2018). Tento fakt se potvrdil i v mé práci. Na rozdíl od práce Liu et al., 2019, ve které došlo v ledvinách myši infikovaných virem Zika k supresi exprese proteinu Bcl-2, v mé práci TBEV aktivitu proteinu Bcl-2 podpořil. U obou zmíněných proteinů navíc vlivem slin došlo ke snížení jejich exprese, a to v případě MCL-1 o 62 % a Bcl-2 o 67 %. Největší rozdíl v aktivitě proteinů byl pozorován u HSP70. Jeho role ve flavivirové infekci byla studována například u JEV, kde HSP70 interagoval s virovými proteiny NS5 a NS3, zvyšoval jejich stabilitu a chránil je tak před degradací. Protože jsou tyto proteiny součástí replikačního komplexu, knockdown HSP70 vyústil ve sníženou replikaci genomu JEV (Ye et al., 2013). Podobnou roli hraje HSP70 i v infekci DENV (Taguwa et al., 2015). Je proto jasné, že pro virus je výhodné zvýšit aktivitu tohoto proteinu. To se v našem experimentu potvrdilo. Virová infekce signifikantně zvýšila relativní aktivitu HSP70. Vlivem slin došlo v infikovaných buňkách k jejímu snížení o 94 %. Tato inhibice může nabízet vysvětlení, proč vlivem slin došlo v pDC ke snížení replikace viru.

Jak už bylo řečeno v teoretické části, apoptóza může probíhat dvěma způsoby. Vnější cesta začíná aktivací receptorů smrti. V naší práci byly sledovány receptory Fas, TNF RI a TRAIL R2. K signifikantnímu rozdílu mezi skupinami došlo jen u posledního zmíněného, kdy infekce způsobila snížení jeho relativní aktivity. Přítomnost slin na expresi však neměla vliv. Klíčovým bodem vnitřní cesty apoptózy je mitochondrie a uvolňovaný cytochrom c. Virová

infekce ani přítomnost slin v infikovaných buňkách jeho expresi nijak neovlivnila. Důležitým bodem průběhu apoptózy je kaspáza-3. Ani na její expresi neměla infekce Hyprem ani přítomnost slin žádný efekt. S přihlédnutím k výsledkům přežívání pDC, kdy virová infekce měla na přežívání buněk pozitivní vliv, se zdá, že k apoptóze v pDC vlivem infekce nedochází. Přítomnost slin v infikovaných buňkách naopak viabilitu buněk signifikantně snižovala, což je odlišné od mDC, ve kterých klíštěcí sliny přežívání infikovaných buněk zvyšují (Lieskovská et al., 2018). Vzhledem k tomu by bylo žádoucí v dalším zkoumání sledovat v pDC další typ buněčné smrti, proces autofágie, který by mohl toto zjištění osvětlit.

6 ZÁVĚR

- Klíštěcí sliny nemají vliv na replikaci TBEV v LC.
- Klíštěcí sliny 72 hodin po infekci inhibují replikaci TBEV v pDC.
- Vlivem infekce TBEV dochází v LC k autofágii, která je klíštěcími slinami snížena.
- Klíštěcí sliny inhibují apoptózu v LC upregulací P-Akt a inhibicí kaspázy-3.
- Infekce TBEV má pozitivní vliv na přežívání pDC.
- Přítomnost klíštěcích slin inhibuje viabilitu infikovaných pDC.
- Klíštěcí sliny inhibují množství fosfatidylserinu v infikovaných pDC bez ohledu na přežívání buňky.
- HSP70 je během virové infekce silně upregulovaný a přítomnost klíštěcích slin způsobuje jeho inhibici.
- V pDC nedochází k apoptóze vnější ani vnitřní cestou.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-AAD	7-aminoactinomycin D
A549 buňky	buňky lidského adenokarcinomu odvozené od alveolárních buněk typu II
Akt	Proteinkináza B
Apaf	aktivační faktor apoptotických proteáz (z angl. <i>apoptotic protease activating factor</i>)
APS	peroxodisíran amonný
ATG	z angl. <i>autophagy related genes</i>
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	z angl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BOFES	bovinní (hovězí) fetální sérum
BSA	bovinní (hovězí) sérový albumin
BTLA	z angl. <i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
CD	z angl. <i>cluster of differentiation</i>
cDC	konvenční dendritické buňky
CMC	karboxymethylcelulóza
CNS	centrální nervový systém
DAMPs	z angl. <i>damage (danger)-associated molecular patterns</i>
DC	dendritické buňky
DENV	dengue virus
DISC	z angl. <i>death inducing signaling komplex</i>
DMEM	z angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELFO	elektroforéza
ER	endoplazmatické retikulum
FACS	z angl. <i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FADD	z angl. <i>Fas-associated protein with death domain</i>
FLT3	z angl. <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FVD	z angl. <i>fixable viability dye</i>
GM-CSF	z angl. <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HO	hemová oxygenáza

Hpi	hodiny po infekci
HRP	křenová peroxidáza
HSP	protein teplotního šoku
IFN	interferon
IL	interleukin
IRF	interferon regulační faktor
ISGF	interferonem stimulovaný genový faktor
ISGs	interferonem stimulované geny
JAK	Janus kináza
JEV	virus japonské encefalitidy
LBP	protein vázající laminin (z angl. <i>aminin binding protein</i>)
LC	Langerhansovy buňky
LGTV	Langat virus
MCL-1	z angl. <i>myeloid cell leukemia 1</i>
M-CSF	z angl. <i>macrophage colony stimulating factor</i>
mDC	myeloidní dendritické buňky
MEM	minimální esenciální médium
MFI	střední hodnota fluorescence
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	makrofágový zánětlivý protein
MoDC	dendritické buňky derivované z monocytů
mTOR	serin/threoninová kináza (z angl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PAMPs	z angl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₂	fosfatidylinositol bisfosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol trifosfát
PRR	receptor rozpoznávající patogeny (z angl. <i>pathogen recognition receptors</i>)
PS buňky	buňky prasečí ledviny, (z angl. <i>porcine kidney stable</i>)
PTS	prekolostrální telecí sérum
RIG-I	typ cytoplazmatického receptoru (z angl. <i>retinoic acid-inducible gene I</i>)

RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsírán sodný
STAT	z angl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBEV	virus klíšťové encefalitidy (z angl. <i>Tick-borne encephalitis virus</i>)
TBS	z angl. <i>tris-buffered saline</i>
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF	z angl. <i>transforming growth factor</i>
TGN	trans Golgi systém
TLR	Toll-like receptor
TNF	z ang. <i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	z angl. <i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL R2	z angl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>
WNV	virus západonilské horečky
XIAP	X-vázaný inhibitor apoptózy

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, J.M., and Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ.* 25, 27–36.
- Amara, A., and Mercer, J. (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 461–469.
- Anderson, J.F., and Magnarelli, L.A. (2008). Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22, 195–215.
- Appelt, U., Sheriff, A., Gaipf, U.S., Kalden, J.R., Voll, R.E., and Herrmann, M. (2005). Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: Cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for PS-dependent clearance. *Cell Death Differ.* 12, 194–196.
- Bao, M., and Liu, Y.J. (2013). Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* 4, 40–52.
- Bell, D., Young, J.W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72, 255–324.
- Berger, C.L., Vasquez, J.G., Shofner, J., Mariwalla, K., and Edelson, R.L. (2006). Langerhans cells: Mediators of immunity and tolerance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1632–1636.
- Bílý, T., Palus, M., Eyer, L., Elsterová, J., Vancová, M., and Růžek, D. (2015). Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons. *Sci. Rep.* 5.
- Birge, R.B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R.A., Huang, X., Hutchins, J.T., et al. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* 23, 962–978.
- Bogovic, P. (2015). Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases* 3, 430.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L., and Maliszewski, C.R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029–3039.
- Callahan, M.K., Williamson, P., and Schlegel, R.A. (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ.* 7, 645–653.
- Carrington, E.M., Zhang, J.G., Sutherland, R.M., Vikstrom, I.B., Brady, J.L., Soo, P., Vremec, D., Allison, C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Prosurvival Bcl-2 family members

- reveal a distinct apoptotic identity between conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 4044–4049.
- Carvalho-Costa, T.M., Mendes, M.T., Da Silva, M.V., Da Costa, T.A., Tiburcio, M.G.S., Anhê, A.C.B.M., Rodrigues, V., and Oliveira, C.J.F. (2015). Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasites and Vectors* *8*, 22.
- Catteau, A., Kalinina, O., Wagner, M.C., Deubel, V., Courageo, M.P., and Desprès, P. (2003). Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J. Gen. Virol.* *84*, 2781–2793.
- Choi, A.M.K., and Alam, J. (1996). Heme Oxygenase-1: Function, Regulation, and Implication of a Novel Stress-inducible Protein in Oxidant-induced Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *15*, 9–19.
- Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* *154*, 3–20.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1219–1226.
- Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J.M. (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* *256*, 34–41.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T.M., and Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon $\alpha\beta$ in acute influenza infection. *Nat. Commun.* *5*, 1–15.
- Deisseroth, A., and Dounce, A.L. (1970). Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* *50*, 319–375.
- Diehl, N., and Schaal, H. (2013). Make yourself at home: Viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses* *5*, 3192–3212.
- Dillon, S.R., Mancini, M., Rosen, A., and Schlissel, M.S. (2000). Annexin V Binds to Viable B Cells and Colocalizes with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. *J. Immunol.* *164*, 1322–1332.
- Doebel, T., Voisin, B., and Nagao, K. (2017). Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol.* *38*, 817–828.
- Elkon, K.B. (2013). Apoptosis, Necrosis, and Autophagy. In *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes: Eighth Edition*, (Elsevier Inc.), pp. 115–126.

- Esashi, E., Wang, Y.H., Perng, O., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Watowich, S.S. (2008). The Signal Transducer STAT5 Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Development by Suppressing Transcription Factor IRF8. *Immunity* 28, 509–520.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.L., and Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 157–183.
- Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., and O’Keeffe, M. (2008). M-CSF: A novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150–159.
- Fensterl, V., and Sen, G.C. (2009). Interferons and viral infections. *BioFactors* 35, 14–20.
- Fialová, A., Cimburek, Z., Iezzi, G., and Kopecký, J. (2010). Ixodes ricinus tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes Infect.* 12, 580–585.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., and Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 433–442.
- Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J.P., Dy, M., Brousse, N., and Hermine, O. (1998). Transforming growth factor β 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic langerhans cells. *J. Exp. Med.* 187, 961–966.
- Ghosh Roy, S., Datan, E., Sadigh, B., Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2014). Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J Biol Chem* 5, 93–105.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.L., Trinchieri, G., O’Garra, A., and Liu, Y.J. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 195, 953–958.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
- Greijer, A.E., and Van Der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 57, 1009–1014.
- Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A., and Gould, E.A. (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 57, 129–146.
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185, 1101–1111.
- Hajnická, V., Fuchsberger, N., Slovák, M., Kocakova, P., Labuda, M., and Nuttall, P.A.

- (1998). Tick salivary gland extracts promote virus growth in vitro. *Parasitology* 116, 533–538.
- Heaton, N.S., and Randall, G. (2011). Dengue virus and autophagy. *Viruses* 3, 1332–1341.
- Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S.R., Losson, B., Saegerman, C., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., et al. (2010). A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8, 33–50.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777.
- Intagliata, S., Salerno, L., Ciaffaglione, V., Leonardi, C., Fallica, A.N., Carota, G., Amata, E., Marrazzo, A., Pittalà, V., and Romeo, G. (2019). Heme Oxygenase-2 (HO-2) as a therapeutic target: Activators and inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 183, 111703.
- Iranpour, M., Moghadam, A.R., Yazdi, M., Ande, S.R., Alizadeh, J., Wiechec, E., Lindsay, R., Drebot, M., Coombs, K.M., and Ghavami, S. (2016). Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 18, e1.
- Jardine, L., Barge, D., Ames-Draycott, A., Pagan, S., Cookson, S., Spickett, G., Haniffa, M., Collin, M., and Bigley, V. (2013). Rapid detection of dendritic cell and monocyte disorders using CD4 as a lineage marker of the human peripheral blood antigen-presenting cell compartment. *Front. Immunol.* 4.
- Kazimírová, M., and Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., and Nuttall, P.A. (2017). Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 339.
- Kirsch, J.M., Mlera, L., Offerdahl, D.K., VanSickle, M., and Bloom, M.E. (2020). Tick-borne flaviviruses depress AKT activity during acute infection by modulating AKT1/2. *Viruses* 12.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* (80-.). 275, 1132–1136.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M.B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J.H.F., Kotsyfakis, M., and Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *J. Proteomics* 128, 58–68.

- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. (2007). Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon- α Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses. *Immunity* 27, 240–252.
- Kuranaga, E. (2012). Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes to Cells* 17, 83–97.
- Lee, C.-J., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2005). Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *J. Virol.* 79, 8388–8399.
- Lee, Y.R., Lei, H.Y., Liu, M.T., Wang, J.R., Chen, S.H., Jiang-Shieh, Y.F., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, C.C., and Liu, H.S. (2008). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 374, 240–248.
- Li, J.K., Liang, J.J., Liao, C.L., and Lin, Y.L. (2012). Autophagy is involved in the early step of japanese encephalitis virus infection. *Microbes Infect.* 14, 159–168.
- Libraty, D.H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., Endy, T.P., and Ennis, F.A. (2001). Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis. *J. Virol.* 75, 3501–3508.
- Lieskovská, J., and Kopecký, J. (2012a). Tick saliva suppresses IFN signalling in dendritic cells upon *Borrelia afzelii* infection. *Parasite Immunol.* 34, 32–39.
- Lieskovská, J., and Kopecký, J. (2012b). Effect of tick saliva on signalling pathways activated by TLR-2 ligand and *Borrelia afzelii* in dendritic cells. *Parasite Immunol.* 34, 421–429.
- Lieskovská, J., Páleníková, J., Langhansová, H., Chmelař, J., and Kopecký, J. (2018). Saliva of *Ixodes ricinus* enhances TBE virus replication in dendritic cells by modulation of pro-survival Akt pathway. *Virology* 514, 98–105.
- Lin, C.-F., Lei, H.-Y., Shiau, A.-L., Liu, H.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., Liu, C.-C., Chiu, S.-C., and Lin, Y.-S. (2002). Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. *J. Immunol.* 169, 657–664.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 45–54.
- Liu, T., Tang, L., Tang, H., Pu, J., Gong, S., Fang, D., Zhang, H., Li, Y.-P., Zhu, X., Wang, W., et al. (2019). Zika Virus Infection Induces Acute Kidney Injury Through Activating NLRP3 Inflammasome Via Suppressing Bcl-2. *Front. Immunol.* 10, 1925.
- Lutz, M.B., Strobl, H., Schuler, G., and Romani, N. (2017). GM-CSF monocyte-derived cells and langerhans cells as part of the dendritic cell family. *Front. Immunol.* 8, 1388.

- MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* *100*, 4512–4520.
- Mandl, C.W. (2005). Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* *111*, 161–174.
- Mansfield, K.L., Johnson, N., Phipps, L.P., Stephenson, J.R., Fooks, A.R., and Solomon, T. (2009). Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* *90*, 1781–1794.
- Matta, B.M., Castellaneta, A., and Thomson, A.W. (2010). Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2667–2676.
- Minn, A.J., Vélez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-X(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* *385*, 353–356.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: Process and function. *Genes Dev.* *21*, 2861–2873.
- Mortimore, G.E., and Poso, A.R. (1987). Intracellular Protein Catabolism and its Control During Nutrient Deprivation and Supply. *Annu. Rev. Nutr.* *7*, 539–568.
- Musumeci, A., Lutz, K., Winheim, E., and Krug, A.B. (2019). What makes a PDC: Recent advances in understanding plasmacytoid DC development and heterogeneity. *Front. Immunol.* *10*, 1222.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., and Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press Inc.), pp. 99–128.
- Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., Yenchitsomanus, P. Thai, and Limjindaporn, T. (2010). Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res.* *147*, 275–283.
- Neufeldt, C.J., Cortese, M., Acosta, E.G., and Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat. Rev. Microbiol.* *16*, 125–142.
- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H., and Brown, R.N. (2018). Ticks (Ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology*, (Elsevier), pp. 603–672.
- Okamoto, T., Suzuki, T., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., and Matsuura, Y. (2017). Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* *9*, 243.
- Oliveira, C.J.F., Cavassani, K.A., Moré, D.D., Garlet, G.P., Aliberti, J.C., Silva, J.S., and Ferreira, B.R. (2008). Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int. J. Parasitol.* *38*, 705–716.

- Palmer, D.R., Sun, P., Celluzzi, C., Bisbing, J., Pang, S., Sun, W., Marovich, M.A., and Burgess, T. (2005). Differential Effects of Dengue Virus on Infected and Bystander Dendritic Cells. *J. Virol.* *79*, 2432–2439.
- Pulkkinen, L., Butcher, S., and Anastasina, M. (2018). Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses* *10*, 350.
- Ramanathan, M.P., Chambers, J.A., Pankhong, P., Chattergoon, M., Attatippaholkun, W., Dang, K., Shah, N., and Weiner, D.B. (2006). Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology* *345*, 56–72.
- Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* *17*, 3225–3236.
- Robertson, S.J., Mitzel, D.N., Taylor, R.T., Best, S.M., and Bloom, M.E. (2009). Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures. *Immunol. Res.* *43*, 172–186.
- Romani, N., Clausen, B.E., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* *234*, 120–141.
- Růžek, D., Dobler, G., and Mantke, O.D. (2010). Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Med. Infect. Dis.* *8*, 223–232.
- Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S., and Manz, M.G. (2010). Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol. Rev.* *234*, 32–44.
- Semple, J.I., Smits, V.A.J., Fernaud, J.R., Mamely, I., and Freire, R. (2007). Cleavage and degradation of Claspin during apoptosis by caspases and the proteasome. *Cell Death Differ.* *14*, 1433–1442.
- Silva, M.C., Guerrero-Plata, A., Gilfoy, F.D., Garofalo, R.P., and Mason, P.W. (2007). Differential Activation of Human Monocyte-Derived and Plasmacytoid Dendritic Cells by West Nile Virus Generated in Different Host Cells. *J. Virol.* *81*, 13640–13648.
- Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., and Kopecký, J. (2008). Tick Saliva Inhibits Dendritic Cell Migration, Maturation, and Function while Promoting Development of Th2 Responses. *J. Immunol.* *180*, 6186–6192.
- Slámová, M., Skallová, A., Páleníková, J., and Kopecký, J. (2011). Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite Immunol.* *33*, 654–660.
- Song, Z., and Steller, H. (1999). Death by design: Mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol.* *9*, M49–M52.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral

- lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* (80-.). *267*, 1445–1449.
- Styer, L.M., Lim, P.-Y., Louie, K.L., Albright, R.G., Kramer, L.D., and Bernard, K.A. (2011). Mosquito Saliva Causes Enhancement of West Nile Virus Infection in Mice. *J. Virol.* *85*, 1517–1527.
- Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., Du, S., Fan, H., Chen, C.H., Zhang, R., et al. (2020). A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nat. Commun.* *11*, 1–15.
- Suzuki, T., Okamoto, T., Katoh, H., Sugiyama, Y., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., Fukuhara, T., Ikawa, M., et al. (2018). Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. *PLoS Pathog.* *14*.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 471–485.
- Taguwa, S., Maringer, K., Li, X., Bernal-Rubio, D., Rauch, J.N., Gestwicki, J.E., Andino, R., Fernandez-Sesma, A., and Frydman, J. (2015). Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell* *163*, 1108–1123.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.* *445*, 77–88.
- Urbanowski, M.D., and Hobman, T.C. (2013). The West Nile Virus Capsid Protein Blocks Apoptosis through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *J. Virol.* *87*, 872–881.
- Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1991). Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. *Cancer Res.* *51*.
- Valladeau, J., and Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 273–283.
- Vandergaast, R., and Fredericksen, B.L. (2012). West Nile Virus (WNV) Replication Is Independent of Autophagy in Mammalian Cells. *PLoS One* *7*, e45800.
- Vesely, D.L., Fish, D., Shlomchik, M.J., Kaplan, D.H., and Bockenstedt, L.K. (2009). Langerhans cell deficiency impairs *Ixodes scapularis* suppression of Th1 responses in mice. *Infect. Immun.* *77*, 1881–1887.
- Wang, X., Gorospe, M., Huang, Y., and Holbrook, N.J. (1997). P27(Kip1) overexpression

causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene* 15, 2991–2997.

- Wawryk-Gawda, E., Chylińska-Wrzos, P., Lis-Sochocka, M., Chłapek, K., Bulak, K., Jędrych, M., and Jodłowska-Jędrych, B. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* 251, 525–533.
- Yang, M.R., Lee, S.R., Oh, W., Lee, E.W., Yeh, J.Y., Nah, J.J., Joo, Y.S., Shin, J., Lee, H.W., Pyo, S., et al. (2008). West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell. Microbiol.* 10, 165–176.
- Yang, T.C., Shiu, S.L., Chuang, P.H., Lin, Y.J., Wan, L., Lan, Y.C., and Lin, C.W. (2009). Japanese encephalitis virus NS2B-NS3 protease induces caspase 3 activation and mitochondria-mediated apoptosis in human medulloblastoma cells. *Virus Res.* 143, 77–85.
- Ye, J., Chen, Z., Zhang, B., Miao, H., Zohaib, A., Xu, Q., Chen, H., and Cao, S. (2013). Heat Shock Protein 70 Is Associated with Replicase Complex of Japanese Encephalitis Virus and Positively Regulates Viral Genome Replication. *PLoS One* 8.