

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv klíštěcích slin na endoplazmatický stres v buňkách  
infikovaných virem klíšťové encefalitidy**

Diplomová práce

**Bc. Markéta Spěváková**

Školitelka: Mgr. Jaroslava Liesková, Ph.D.

Školitelka-specialistka: Mgr. Zuzana Beránková

České Budějovice 2021

## **Diplomová práce**

Spěváková, M., 2021: Vliv klíštěcích slin na endoplazmatický stres v buňkách infikovaných virem klíšťové encefalitidy. [Effect of tick saliva on endoplasmic stress in cells infected with tick-borne encephalitis virus. Mgr. Thesis, in Czech.] – 61 p., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation:**

The aim of this study was to evaluate the effect of tick saliva on endoplasmic stress in PMJ2-R cells infected with tick-borne encephalitis virus. The endoplasmic stress was analysed through 3 different branches of unfolded protein response: ATF-6, PERK and IRE-1. Moreover, the thesis deals with the effect of tick salivary protein Iristatin on endoplasmic stress in infected cells.

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

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

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2021

.....

Markéta Spěváková

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. za odborné vedení práce a za všechny rady a čas, který mi věnovala. Poděkování patří také Mgr. Zuzaně Beránkové, která mě seznámila s jednotlivými laboratorními metodami a byla mi nápomocná během mých experimentů. V neposlední řadě děkuji mému příteli, rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

# OBSAH

1	LITERÁRNÍ ÚVOD .....	1
1.1	Virus klíšťové encefalitidy .....	1
1.1.1	Taxonomie a výskyt .....	1
1.1.2	Struktura viru .....	1
1.1.3	Replikační cyklus viru .....	2
1.1.4	Přenos viru klíšťové encefalitidy .....	3
1.1.5	Patogeneze klíšťové encefalitidy .....	3
1.1.6	Klinické příznaky klíšťové encefalitidy .....	4
1.2	Odpověď buňky na virovou infekci .....	5
1.2.1	Role interferonu při virové infekci .....	5
1.2.2	Stres endoplazmatického retikula a UPR .....	6
1.2.3	Flaviviry a UPR .....	9
1.3	Klíště .....	12
1.3.1	Klíště jako vektor patogenů .....	13
1.3.2	Sliny klíštěte .....	13
1.3.3	Iristatin .....	16
2	CÍLE PRÁCE .....	17
3	MATERIÁL A METODY .....	18
3.1	Materiál .....	18
3.1.1	Buněčná linie .....	18
3.1.2	Virus klíšťové encefalitidy .....	18
3.1.3	Klíštěcí sliny .....	18
3.1.4	Iristatin .....	18
3.2	Metody .....	19
3.2.1	Příprava a infekce buněk .....	19
3.2.2	Příprava proteinových vzorků .....	20

3.2.3	Příprava RNA vzorků .....	21
3.2.4	Stanovení aktivace ATF-6 dráhy UPR .....	21
3.2.5	Stanovení aktivace PERK dráhy UPR.....	25
3.2.6	Stanovení aktivace IRE-1 dráhy UPR .....	26
3.2.7	Exprese virové mRNA .....	28
3.2.8	Statistické vyhodnocení dat .....	29
4	VÝSLEDKY.....	30
4.1	Stanovení UPR ve virem infikovaných buňkách .....	30
4.2	Vliv klíštěcích slin na aktivaci UPR .....	33
4.3	Vliv Iristatinu na aktivaci UPR.....	37
4.4	Vliv slin a Iristatinu na replikaci virové mRNA v infikovaných buňkách .....	41
5	DISKUZE .....	43
6	ZÁVĚR.....	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	49
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	51

# 1 LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 Virus klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida je vážné neuroinfekční onemocnění, jehož původcem je virus klíšťové encefalitidy (TBEV- z ang. tick-borne encephalitis virus). TBEV byl poprvé vyizolován v roce 1937 ruským mikrobiologem, virologem a imunologem Lvem Zilberem. TBEV patří do skupiny arbovirů, které jsou specifické tím, že jsou přenášeny členovci. V případě TBEV je vektorem klíště, a to především *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*. Tato neuroinfekce se běžně vyskytuje v Evropě a v Asii (Gritsun et al., 2013a; Mansfield et al., 2009).

### 1.1.1 Taxonomie a výskyt

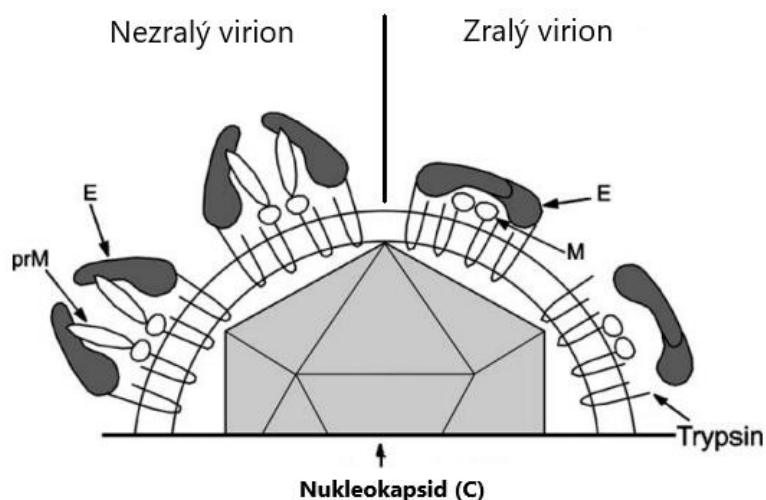
TBEV se řadí do čeledi *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. Flaviviry jsou skupinou čítající více jak 50 různých druhů virů, přičemž asi polovina je lidským patogenem. Vektorem flavivirů je často klíště nebo komár. Hostiteli těchto virů jsou zejména savci a ptáci, u kterých má infekce asymptomatické až vážné nebo dokonce fatální projevy. Vedle virů komplexu klíšťových encefalitid rozlišujeme v rámci této čeledi ještě další skupiny virů, jimiž jsou například viry dengue, Zika virus (ZKV) či virus žluté zimnice, podle kterého flaviviry získaly svůj název. Komplex klíšťových encefalitid kromě samotného TBEV zahrnuje například virus Omské hemoragické horečky, virus Langat (LGTV) nebo virus Powassan (Grard et al., 2007; Simmonds et al., 2017).

TBEV je endemický v mnoha zemích Evropy, na Dálném východě (oblast Sibiře) a na severu Číny a Japonska. Rozlišují se celkem tři subtypy TBEV – evropský, sibiřský a dálnévýchodní. Evropský subtyp je přenášen pomocí vektoru *Ixodes ricinus*, u dálnévýchodního a sibiřského subtypu je přenašečem *Ixodes persulcatus* (Ecker et al., 1999).

### 1.1.2 Struktura viru

TBEV je, stejně jako ostatní Flaviviry, obaleným virem o velikosti přibližně 50 nm. Genom viru tvoří jednovláknová 11 kb dlouhá RNA pozitivní polarity. Tato RNA slouží jako infekční messenger RNA (mRNA) kódující jeden otevřený čtecí rámeček (ORF), který je obklopen nekódujícími oblastmi na obou (5' a 3') koncích. ORF je translatován v jeden polyprotein tvořený 3 414 aminokyselinami, který je dále štěpen pomocí virových a buněčných proteáz na virové proteiny – 3 strukturální a 7 nestrukturálních. Strukturální proteiny viru zahrnují kapsidový protein C, prekurzor membránového proteinu M (prM) a glykoprotein E. Kapsidový protein C tvoří spolu s jednovláknovou RNA nukleokapsid, který je uložen ve fosfolipidovém obalu obsahujícím zbylé dva strukturální proteiny viru – prM a glykoprotein

E. Nestructurálními proteiny jsou: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Heinz & Allison, 2003).



**Obr. 1:** Struktura virionu klíšťové encefalitidy (převzato a upraveno dle Heinz, 2003).

### **1.1.3 Replikační cyklus viru**

Replikační cyklus TBEV je zahájen interakcí virionů s povrchem hostitelské buňky – vir vstupuje do buňky prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy. Nízké pH v endozomu umožňuje konformační změny proteinu E, díky kterým dochází k fúzi buněčné a virové membrány. Následně je nukleokapsid viru uvolněn do cytosolu buňky a jednovláknová RNA pozitivní polaritě (+ssRNA) se odděluje od kapsidu. Jakmile se RNA nachází v cytosolu buňky, je replikace viru zahájena. Pomocí ribozomů drsného endoplazmatického retikula (ER) je +ssRNA translatována do jednoho polyproteinu, jehož následný sestřih na 3 strukturální a 7 nestructurálních proteinů je uskutečněn prostřednictvím virových a hostitelských proteáz (Mukhopadhyay et al., 2005).

Syntéza virové RNA se odehrává v replikačním komplexu, který zahrnuje virovou dvouvláknovou RNA, nestructurální proteiny a řadu hostitelských faktorů. Genomová +ssRNA je templátem pro nově vznikající komplementární negativní vláknou RNA, na jehož syntéze se podílí nestructurální protein NS5 jako RNA-dependentní-RNA-polymeráza. Výsledkem je přechodná dvouvláknová forma virové RNA, kterou NS3 pomocí NS3 helikázy rozpojí a umožní tak tvorbu velkého množství +ssRNA. Celý replikační komplex se nachází na membráně ER (Duan et al., 2019).

Nově syntetizovaná virová RNA a strukturální proteiny se vychlipují z lumen ER, na povrchu ER pak dochází k hromadění nezralých obalených virových částic, jejichž fúzní smyčku E proteinů kryjí prM peptidy (viz Obr. 1), které tak zabraňují fúzi s intracelulárními membránami a zamezují předčasnému zrání částice. Nezralé virové částice jsou transportovány do Golgiho a trans-Golgiho aparátu, kde je protein prM před uvolněním virionu z buňky štěpen proteázou furinem. Tímto štěpením je zajištěna schopnost fúze virionu s další hostitelskou buňkou, virion se tak stává infekčním. Zralé virové částice buňku opouštějí prostřednictvím exocytózy v cytoplasmatických vezikulách (Pulkkinen et al., 2018).

#### **1.1.4 Přenos viru klíšťové encefalitidy**

Přenos TBEV je uskutečněn během sání klíštěte na hostiteli prostřednictvím jeho slin. Za hlavní hostitele a rezervoáry viru jsou považováni drobní hlodavci, ve kterých je virus schopný se replikovat, ale i přetrvávat. Při sání neinfikovaného klíštěte na již infikovaném hostiteli může dojít k přenosu viru z hostitele na sající klíště. (Dörrbecker et al., 2010) Avšak nejčastějším způsobem přenosu infekce na neinfikované klíště je tzv. sousání, tj. současné sání dvou klíšťat v těsné blízkosti. Sousání je pravděpodobně nejefektivnější způsob přenosu viru - není závislé na vzniku virémie a je tak základem dlouhodobého přenosu a přežívání viru v přírodních ohniscích (Randolph, 2011). Dalším způsobem přenosu viru mezi klíšťaty je transovariální cesta, kdy dochází k přenosu z infikované samice na vajíčka a transstadialní cesta, kdy dochází k přenosu viru z jedince nižšího vývojového stadia na jedince vyššího vývojového stadia (Dörrbecker et al., 2010).

Kromě nákazy skrze infikované klíště jsou zaznamenány i případy infekce člověka prostřednictvím nepasterizovaného mléka od nakaženého dobytka. Alimentárně přenesená infekce se od běžně přeneseného onemocnění odlišuje inkubační dobou, která je udávaná v rozmezí 2-4 dnů. Na druhé straně medián inkubační doby klíštětem přenosné KE je 8 dní. Skot a další větší savci jsou, stejně jako člověk, pouze náhodným hostitelem (Hudopisk et al., 2012; Dörrbecker et al., 2010).

#### **1.1.5 Patogeneze klíšťové encefalitidy**

Virus se ze slinných žláz klíštěte dostává do organismu člověka během prvních několika minut sání. Prvním orgánem přicházejícím do kontaktu s virem je kůže v místě sání, kde jsou pravděpodobně Langerhansovy buňky prvními buňkami, ve kterých se virus replikuje. Dále k replikaci viru dochází i v lokálních makrofázích a neutrofilech. Sekundární virémie vzniká v důsledku transportu viru dendritickými buňkami do lymfatických uzlin. Během této fáze vir prostřednictvím krevního řečiště překonává hematoencefalickou bariéru a dostává se do



mozku. Virus směřuje i do dalších orgánů - především do retikuloendotelového systému, do kterého patří slezina, játra a kostní dřeň. Pokud vir vstupuje do organismu s potravou (mléko, mléčné výrobky), nejdříve se zřejmě replikuje v buňkách epitelu střeva. Hlavním cílem této klíšťaty přenášené infekce jsou nervové buňky (Růžek et al., 2010; Mansfield et al., 2009; Dörrbecker et al., 2010).

Infekce nervových buněk vede k migraci specifických T lymfocytů a mikroglíí do centrální nervové soustavy (CNS) a šedé hmoty mozkové. Výsledkem infekce neuronů je jejich dysfunkce, apoptóza a nekróza (Růžek et al., 2010).

#### **1.1.6 Klinické příznaky klíšťové encefalitidy**

Klinické příznaky onemocnění jsou velice dobře zdokumentované, a to napříč všemi subtypy, mezi kterými se vyskytují určité odlišnosti. Inkubační doba evropského subtypu TBEV obvykle trvá 7-14 dnů, po níž následuje typický dvoufázový průběh nemoci. Příznaky první, 2-4 dny dlouhé, fáze se podobají chřipce: únava, nechutenství, bolest hlavy a svalů, zvýšená teplota apod. Druhá fáze často předchází období 2-10 dnů, které je bezpříznakové. Druhá fáze onemocnění se objevuje pouze u 20-30 % pacientů, u kterých se vyskytují příznaky s odlišnou závažností. Tato neurologické fáze může mít podobu meningitidy, meningoencefalitidy, meningoencefalomyelitidy nebo meningoencefaloradikulitidy (Růžek et al., 2010). V případě tohoto subtypu je onemocnění fatální v 1-2 % případů (Ecker et al., 1999).

Dálněvýchodní subtyp se od evropského odlišuje jednofázovým průběhem s vážnějším postihnutím CNS a častějšími neurologickými následky (Dörrbecker et al., 2010). Jedná se o nejfatálnější formu TBE a onemocnění mívá závažnější průběh u dětí. Na druhou stranu sibiřský subtyp je méně závažný, ale s častějším chronickým průběhem onemocnění (Gritsun et al., 2013).

## 1.2 Odpověď buňky na virovou infekci

Viry jsou obligátními intracelulárními parazity, kteří manipulují hostitelskou buňkou ve svůj prospěch. Záměrem viru je infikovat cílové buňky, replikovat se v nich a dál se šířit. Replikace virového genomu probíhá v buňkách, které jsou k viru vnímavé a disponují potřebným metabolismem umožňujícím virovou replikaci. V infikovaném organismu je pak virem indukováno spuštění imunitních mechanismů, které mají za úkol infikovanou buňku zničit a znemožnit tak úspěšnou replikaci viru a jeho další šíření. Tato obrana hostitele zahrnuje přirozenou imunitní odpověď, která spočívá v likvidaci infikovaných buněk fagocytujícími buňkami, v produkci interferonu, aktivaci komplementu a vzniku zánětu. Specifickou imunitní odpověď představují cytotoxické T lymfocyty, protilátky produkované B buňkami a řada cytokinů regulujících imunitní procesy (Roulston et al., 1999).

### 1.2.1 Role interferonu při virové infekci

Přirozená imunitní odpověď je aktivována díky specifickým receptorům (tzv. PRRs – pattern-recognition receptors), které rozpoznávají virové komponenty známé jako PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). PAMPs jsou takovými komponenty viru, bez kterých se patogen neobejde a které jsou rozpoznávány v různých stádiích jeho životního cyklu: jedná se například o virovou DNA, případně ss/dsRNA, strukturální komponenty nebo povrchové glykoproteiny (Akira et al., 2006).

Mezi PRRs patří toll-like receptory (TLR), které zodpovídají za rozpoznávání PAMPs jak v endosomech, tak v extracelulárním prostoru. Receptory rozpoznávající nukleovou kyselinu v cytosolu jsou označovány jako RLR (RIG-1 like receptors) a je možné je nalézt na různých typech buněk. Na druhou stranu TLR se nacházejí jen na některých specializovaných buňkách, jakými jsou např. dendritické buňky nebo makrofágy. Výsledkem rozpoznání PAMPs receptory je produkce interferonu (INF) prvního typu a řady prozánětlivých cytokinů (Thompson et al., 2011; Takeuchi & Akira, 2009).

Interferony prvního typu jsou sekretovány infikovanými buňkami, ve kterých dochází jejich vlivem k indukci antimikrobiálního stavu, který brání dalšímu šíření infekčních agens. Tento antimikrobiální stav nastává také v sousedních buňkách, které ještě nejsou infikované. Další funkcí INF je schopnost modulovat přirozenou imunitní odpověď prostřednictvím zvýšení prezentace antigenu a stimulace NK buněk. Aktivace adaptivní složky imunitního systému prostřednictvím INF spočívá v rozvoji specifické T a B buněčné odpovědi spolu se vznikem imunologické paměti. Nejvýznamnějším INF prvního typu v obraně proti virovým infekcím je INF- $\alpha$  a INF- $\beta$  (Ivashkiv & Donlin 2014).

Rozpoznání nukleové kyseliny viru receptory a následná produkce INF- $\alpha$  vede ke spuštění signální JAK/STAT dráhy, která je tvořena třemi komponenty: buněčným receptorem, JAK proteiny a STAT proteiny. Tato signální dráha je zodpovědná za indukci transkripce specifických genů v jádře buňky (Aaronson, 2002). Tyto efektorové geny se nazývají IFN stimulované geny (ISG) a jsou základem propracovaného mechanismu, jehož cílem je vir zlikvidovat. ISG jsou objemnou skupinou genů zahrnující geny kódující proteiny, které se uplatňují jak při vstupu viru do buňky (např. TRIM geny), tak při inhibici jeho translace a replikace (např. ISG15 či protein kináza R). Tyto geny jsou však schopné cílit i na virové částice, které již byly translatovány, ale ještě neopustily buňku (např. viperin). ISG jsou tak účinným nástrojem k likvidaci viru v hostitelské buňce (Raftery & Stevenson, 2017).

Ačkoliv ISG jsou často spojovány s širokou antivirovou aktivitou, některé z nich vykazují větší specifitu pro určité druhy infekce. V případě TBEV je možné jmenovat TRIM79 $\alpha$  zamezující replikaci viru pomocí degradace NS5 proteinu, který slouží jako RNA-dependentní-RNA-polymeráza (Taylor et al., 2011). Mezi další ISG, které se uplatňují v infekci TBEV, patří například IPS-1 nebo viperin (Kurahde et al., 2016; Upadhyay et al., 2013).

### **1.2.2 Stres endoplazmatického retikula a UPR**

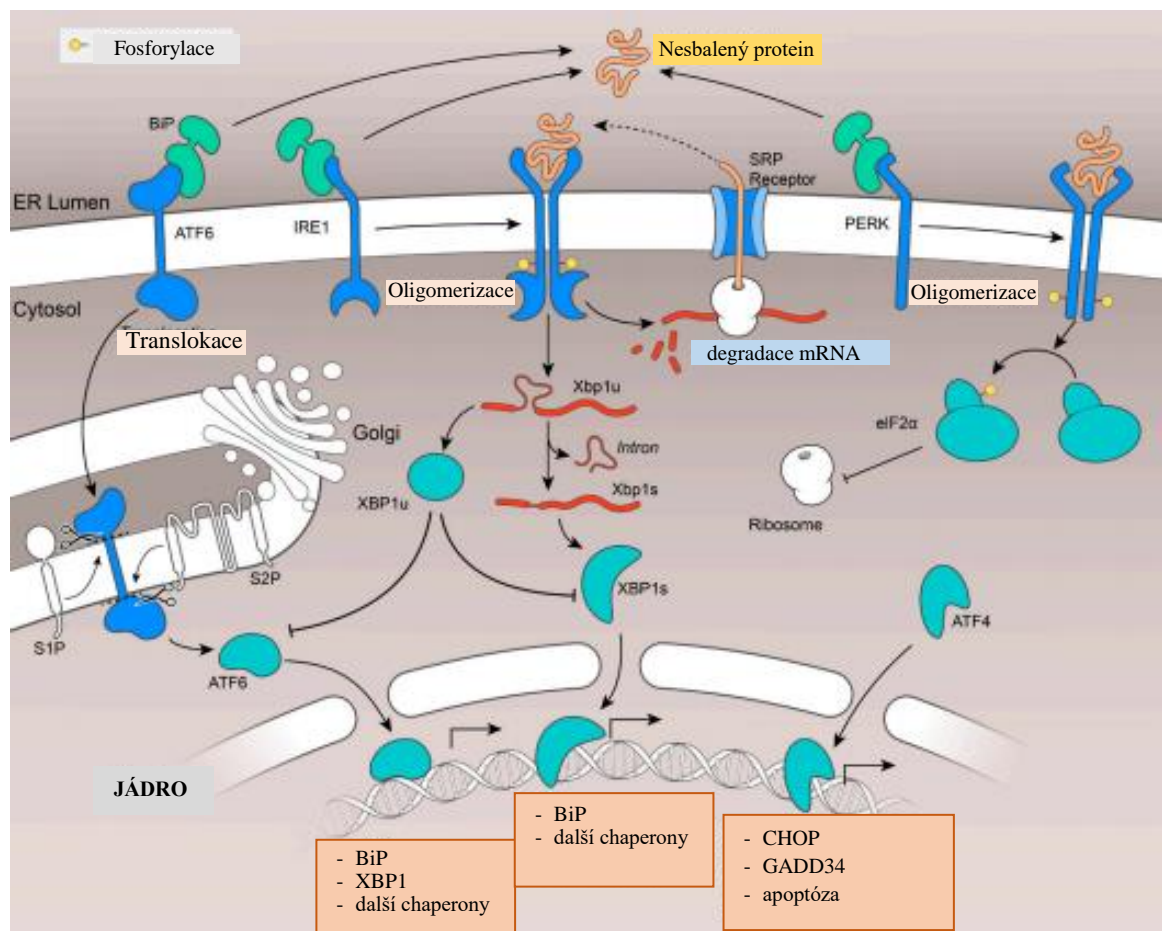
ER je membránovou strukturou, která hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech. ER se podílí na transmembránovém skládání proteinů, buněčné homeostáze kalcia, syntéze lipidů a produktivní sekreci. V ER dochází nejen k syntéze proteinů, ale proteiny jsou zde také skládány do jejich přirozené konformace a podstupují zde další potranslační modifikace. Nesprávně složené proteiny jsou předurčeny k proteazomální degradaci, kdy dochází k narušení jejich peptidických vazeb. Tímto kontrolním mechanismem je zajištěno, že ER opouštějí pouze správně sbalené proteiny (Meusser et al., 2005).

Stres ER je výsledkem vlivu různých fyziologických, chemických či patologických faktorů, které narušují homeostázu ER a podněcují vznik endoplazmatického stresu. Jedním z takových faktorů je právě virová infekce. Akumulace nesložených či nesprávně složených proteinů virového (ale i hostitelského) původu v ER a modifikace membrán ER vedou ke stresové odpovědi prostřednictvím aktivace odpovědi na nesbalené proteiny (UPR), která má za úkol obnovit ztracenou homeostázu ER (Schröder & Kaufman, 2005). UPR zvyšuje množství komponentů, které jsou potřebné pro skládání proteinů (např. chaperony a enzymy), zároveň omezuje translaci a přísun proteinů do ER a podporuje degradaci nesprávně sbalených

proteinů. Pokud se však opět neobnoví homeostáza ER, dojde k apoptóze buňky (Bernales et al., 2006).

K detekci nesprávně sbalených proteinů slouží 3 různé receptory zakotvené v lumenu ER: transkripční aktivující faktor 6 (ATF6), enzym 1 vyžadující inositol (IRE-1) a PKR-podobná ER kináza (PERK). Na tyto receptory je navázaný glukózu regulující protein 78 (BiP/GRP78), který funguje jako chaperon. Během akumulace nesbalených proteinů v lumenu ER se BiP odpoutá od svého receptoru a naváže se na exponované hydrofobní zbytky těchto peptidů. Oddělením BiPu od receptoru dojde ke spuštění specifické dráhy UPR (Bertolotti et al., 2000).

Mechanismus aktivace jednotlivých drah UPR spočívá v interakci BiPu s hydrofobními zbytky nesprávně složených proteinů. BiP obsahuje dvě hlavní domény: doménu s N koncem zahrnující ATP katalyzující část a doménu s C koncem, která je schopna vázat substrát. (McKay, 1993). Obě domény spolu úzce spolupracují: v přítomnosti hydrofobních zbytků nesbalených proteinů dochází k hydrolýze ATP na ADP, která zvyšuje afinitu BiPu pro vazbu peptidového substrátu. Tato vazba umožňuje nesbalenému proteinu se složit do správné konformace. Následná výměna ADP za ATP vede k uvolnění substrátu a k další možné vazbě hydrofobních zbytků. Domény tak zprostředkovávají jak dočasnou vazbu nesbalených proteinů, tak jejich uvolnění, a to do té doby, než je protein správně složen nebo dokud není určen k degradaci (Wei et al., 1995; Gething, 1999).



**Obr. 2:** Schéma znázorňující jednotlivé větve UPR (převzato z Lewy et al., 2017).

### ATF6 dráha

Transkripční faktor ATF6 je syntetizován v ER a je hromaděním nesbalených proteinů aktivován a následně transportován pomocí transportních váčků do Golgiho aparátu (Schindler & Schekman, 2009). V Golgiho aparátu je tento transkripční faktor štěpen pomocí site-1 a site-2 proteázy na ATF6p50 fragment obsahující transkripční faktor zvaný základní leucinový zip (bZIP), který je následně přemístěn do jádra, kde indukuje expresi řady proteinů a chaperonů včetně BiPu a X-box vázajícího proteinu (XBP1). Tato dráha tak zvyšuje efektivitu mechanismů podílejících se na skládání a degradaci nesprávně sbalených proteinů (Bommiasamy et al., 2009).

### PERK dráha

Po rozvolnění vazby BiPu s PERK receptorem dochází k aktivaci PERK dráhy, kterou představuje kináza podstupující oligomerizaci a autofosforylaci. Následně PERK fosforyluje alfa podjednotku eukaryotického translačního inicializačního faktoru 2 (eIF2 $\alpha$ ). Tímto procesem ustává translace většiny buněčné mRNA, dochází tak, za účelem zmírnění endoplazmatického stresu, ke snížení přísunu nově syntetizovaných proteinů do ER. Ačkoliv

je touto fosforylací dočasně syntéza proteinů utlumena, některé mRNA nejsou k této inhibici citlivé. Jedna z takových mRNA kóduje aktivační faktor 4 (ATF4) (Kaufman, 2002).

ATF4 je transkripční faktor aktivující transkripci proteinů, které jsou zahrnuty v řadě buněčných procesů včetně syntézy proteinů, apoptózy a autofágie. Mezi tyto proteiny patří GADD34 (z angl. growth arrest and DNA damage-inducible protein 34) zprostředkovávající defosforylaci eIF2 $\alpha$  a CHOP (z angl. C/EBP homologous protein), který se podílí na vzniku autofágie. Defosforylace eIF2 $\alpha$  představuje zpětnou regulaci této PERK dráhy, díky které dochází v buňce k opětovné syntéze proteinů (Novoa et al., 2001; Harding et al., 2009; Marciniak, 2004).

#### IRE-1 dráha

Třetí dráhou podílející se na zvládnutí endoplazmatického stresu je IRE-1 dráha. IRE-1 $\alpha$  je transmembránová kináza/endoribonukleáza, která za účelem přenosu UPR signálu využívá mRNA sestřih. Obdobně jako u PERK dochází i u této dráhy po disociaci BiPu k její aktivaci oligomerizací a autofosforylací (Walter & Ron, 2011). Jakmile je IRE-1 aktivovaná, je schopna z mRNA kódující UPR-specifický faktor XBP1 vystřihnout intron o velikosti 26 nukleotidů. Tímto sestřihem a následnou ligací vzniká aktivní forma transkripčního faktoru XBP1s (spliced XBP1), která zvyšuje expresi genů hrajících roli v translokaci proteinů, v jejich skládání a sekreci. Zároveň se tento transkripční faktor podílí také na aktivaci genů podněcujících degradaci nesbalených proteinů (Kaufman, 2002; Yoshida et al., 2001).

IRE-1 hraje roli také v procesu zvaném regulovaný IRE-1-závislý rozklad (RIDD), kdy je IRE-1 schopna sestřihu malých sad mRNA či prekurzorových microRNA, které způsobují jejich následnou degradaci. RIDD tak může sloužit jako prostředek ke snížení množství mRNA, které vede k omezení přísunu (nesbalených) proteinů do ER (Hollien et al., 2009; Upton et al., 2012). Zároveň bylo zjištěno, že RIDD má širokou škálu funkcí, protože cílí na různé mRNA (So, 2018).

### **1.2.3 Flaviviry a UPR**

Replikace Flavivirů probíhá v úzké spolupráci s ER, kde dochází k hromadění jak strukturálních, tak nestrukturálních proteinů viru. Viry včetně flavivirů indukují v buňkách řadu mechanismů včetně UPR, která hraje klíčovou roli ve zvládnutí endoplazmatického stresu a mnoho virů je schopna tuto dráhu modulovat ke svým potřebám replikace. Viry využívají zvýšené kapacity pro skládání proteinů či hostitelských chaperonů, které skládání napomáhají. V literatuře je možné nalézt řadu publikací zabývajících se problematikou UPR u

flavivirových infekcí, které docházejí k závěru, že flaviviry aktivují všechny tři dráhy UPR (shrnuto v Lewy et al., 2017; Blázquez et al., 2014).

#### ATF-6 dráha

ATF-6 větev byla detekována například u TBEV, viru západonilské horečky (WNV), viru dengue (DENV), ZKV a dalších (Yu et al., 2013; Carletti et al., 2019; Peña & Harris, 2011; Tan et al., 2018).

U WNV bylo zjištěno, že aktivace ATF6 dráhy při infekci má za úkol nejen indukovat produkci chaperonů podílejících se na skládání proteinů, ale také v buňce podpořit virovou replikaci a udržovat její životaschopnost. Za tímto účelem je v buňce vlivem ATF6 inhibovaná PERK větev, která má schopnost indukovat buněčnou smrt. Vir tak manipuluje UPR ve svůj prospěch (Ambrose & Mackenzie, 2012). ATF6 větev se proto jeví jako nepostradatelný členek ve virové replikaci v hostitelské buňce. Zdá se, že ATF6 dráha má u mírnějších infekcí (jako je např. kmen Kunjin WNV) ochrannou funkci před cytopatickými účinky viru, ale u závažnějších infekcí není pro produkci virových částic nezbytná (Carletti et al., 2019; Ambrose & Mackenzie, 2012). V neposlední řadě bylo zjištěno, že ATF6 je v infikovaných buňkách proteazomálně degradován (Medigeshi et al., 2007).

Při infekci buněk ZKV došel Tan a kol. k závěru, že dochází k přednostní aktivaci IRE1 a ATF6 větve UPR. Dále bylo zjištěno, že během infekce dochází ke zvýšené expresi BiPu a k indukci exprese XBP1s (Tan et al., 2018). Avšak výsledky experimentů kolektivu Turpina navrhuje, že ATF6 větev není během infekce ZKV vůbec indukovaná (Turpin et al., 2020). Obdobně nebyla indukce ATF6 dráhy detekována ani u LGTV (Lewy et al., 2020).

#### PERK dráha

Aktivace PERK dráhy UPR je v infikovaných buňkách spojována s jejich následnou autofágií nebo apoptózou, která je indukovaná expresí CHOP proteinu. Bylo dokázáno, že infekce virem Japonské encefalitidy (JEV) indukuje fosforylaci PERK i eIF2 $\alpha$  a zároveň zvyšuje expresi ATF4 a CHOP (Wang et al., 2019). Obdobné výsledky byly publikované také v souvislosti s WNV včetně exprese GADD34 (Medigeshi et al., 2007). Také bylo zjištěno, že flaviviry jsou schopné aktivovat PERK dráhu prostřednictvím svého nestrukturálního proteinu NS4B (Wang et al., 2019; Medigeshi et al., 2007). Aktivace PERK dráhy byla dále pozorována i v buňkách infikovaných např. LGTV (Lewy et al., 2020) či DENV (Datan et al., 2016).

Součástí této větve UPR je autofágie, charakterizovaná degradací a recyklací buněčných komponentů. Během tohoto procesu vznikají autofagozomy, které fúzíjí s lysozomy za vzniku

autofagolysosomů, ve kterých dochází k samotné degradaci jejich obsahu. Na autofágii se podílejí proteiny ATG5, ATG12, LC3-I a LC3-II (Kabeye et al., 2000; Mizushima et al., 2001). Indikátorem autofágie v infikovaných buňkách je zvýšená modifikace a agregace LC3 v cytoplasmě, která byla detekovaná u řady flavivirů včetně DNV (Lee et al., 2008) a ZKV (Cao et al., 2017).

#### IRE-1 dráha

Aktivace ATF-6 dráhy UPR vede k expresi mRNA XBP1, který je následně sestřižen pomocí aktivované IRE-1 kinázy/endoribonukleázy a vzniká aktivní forma XBP1s. Bylo zjištěno, že exprese XBP1s nehraje zásadní roli v replikaci DNV a JEV v infikovaných buňkách, ale v jistém směru replikaci napomáhá. Ukázalo se, že XBP1 zmírňuje ER stres v buňkách infikovaných těmito flaviviry, a to nejen zvýšením exprese chaperonů podílejících se na skládání proteinů, ale také umožněním degradace proteinů (Yu et al., 2006). K podobným závěrům se dospělo i u WNV, kdy zablokování IRE1 dráhy nemělo žádný negativní dopad na produkci RNA, proteinů a virionů (Ambrose & Mackenzie, 2013). Avšak jiné publikace ukazují, že se role této dráhy v rámci flavivirů liší – např. u ZKV bylo zjištěno, že aktivace IRE-1 a XBP1 zajišťuje optimální replikaci viru (Kolpikova et al., 2020).



### 1.3 Klíště

V přenosu a rozšíření TBEV hraje klíště, jako vektor tohoto viru, důležitou roli. Evropský subtyp klíšťové encefalitidy je přenášen vektorem *Ixodes ricinus*, druhé dva subtypy sdílí stejného vektora, kterým je *Ixodes persulcatus* (Gritsun et al., 2003). Oba druhy se řadí do čeledi *Ixodidae* (klíšťatovití neboli tvrdá klíšťata), rodu *Ixodes* (Anderson & Magnarelli, 2008).

Přirozeným prostředím klíštěte *Ixodes ricinus* je listnatý a smíšený les, kde parazituje na různých druzích obratlovců. Avšak v důsledku stále většího využívání půdy člověkem není výskyt klíštěte ve městech a příměstských oblastech ničím neobvyklým (Rizzoli et al., 2014). Životní cyklus klíštěte zahrnuje 3 parazitická stádia: larvu, která saje na hostiteli 3-5 dní, 4-7 dní sající nymfu a 7-11 dní parazitující dospělou samici klíštěte. Během sání může klíště svůj objem až 200-krát znásobit. Neparazitické období vývojových stádií může trvat několik měsíců nebo dokonce let. Délka celého životního cyklu se udává v rozsahu 2-6 let (Süss, 2003).



**Obr. 3:** Vývojová stádia *Ixodes ricinus*, zleva: larva, nymfa, dospělá samice, dospělý samec (převzato od Stanek et al., 2012).

Aktivita klíšťat není po celý rok stejná, ale váže se na rozdíly teplot v různých ročních obdobích. Minimální teplota pro jejich aktivitu je asi 5-7 °C – to odpovídá prvotnímu výskytu klíšťat v březnu nebo dubnu. Nejvýraznější aktivita je zaznamenána od května do srpna, poté postupně klesá. Tyto odchylky napříč měsíci mají zákonitou souvislost s výskytem případů onemocnění klíšťovou encefalitidou v průběhu roku (Schulz et al., 2014; Süss, 2003).

### **1.3.1 Klíště jako vektor patogenů**

Přenos patogenů včetně TBEV z klíštěte na hostitele je výsledkem několika interakcí, které spolu tvoří pomyslný trojúhelník vzájemných vztahů mezi: patogenem a klíštětem, patogenem a hostitelem, klíštětem a hostitelem (Nuttall & Labuda, 2004).

Aby se určitý druh klíštěte mohl stát úspěšným vektorem patogenu, musí být patogen odolný vůči tkáňovým bariérám v těle klíštěte. Takovou bariérou je například střevo klíštěte, hemocoel či slinné žlázy. Klíště tak svými obrannými mechanismy udržuje „své“ patogeny na takové úrovni, kdy není ovlivněna jeho vitalita ani další vývoj (Nuttall & Labuda, 2004; Hajdušek et al., 2013).

VKE a jiné patogeny jsou z klíštěte přenášeny při jeho sání na hostiteli prostřednictvím slin.

### **1.3.2 Sliny klíštěte**

Klíštěcí sliny jsou produkovány ve slinných žlázách, párovém orgánu, který je uložen anterolatelárně v tělní dutině klíštěte a skládá se z velkého množství alveolů (Bowman & Sauer, 2005). Hlavním komponentem slin je voda, kterou klíště přijímá spolu s ionty prostřednictvím krve a opět vylučuje pomocí slin zpět do hostitele. Dále sliny obsahují proteiny a peptidy, které jsou syntetizovány během sání ve slinných žlázách. Kromě těchto klíštěti vlastních proteinů jsou ve slinách obsaženy také hostitelské proteiny, jedná se zejména o imunoglobuliny nebo například glykoprotein transferin. Další známou složkou jsou exozomy, které mohou mít různý obsah (mRNA, miRNA, proteiny nebo peptidy). Sliny obsahují i jiné, dosud neznámé nebo nespécifikované, komponenty. Neopomenutelným faktem je, že se složení slin během sání mění (Nuttall, 2019a).

Slinnými žlázami je do okolí sacího ústrojí klíštěte produkován tzv. cement, který napomáhá upevnění ústrojí v místě sání (Bowman & Sauer, 2005). Ačkoliv cement úspěšně usnadňuje klíštěti přichycení se, musí vektor překonávat hostitelské obranné mechanismy, a to po celou dobu krmení, které může trvat až 2 týdny (Sonenshine & Roe, 2014). Obcházení reakci hostitele na parazita mu umožňují molekuly obsažené ve slinách, které jsou schopny regulace těchto defenzivních procesů.

#### Vliv na hemostázu

Za normálních okolností by průnik sacího ústrojí kůže hostitele vyvolal hemostatickou odpověď. V místě narušení integrity kůže by došlo k vytvoření hemostatické zátky, aktivaci koagulační kaskády, stažení cév a v neposlední řadě k zánětlivé odpovědi. V tomto případě by

klíště nebylo schopné dokončit krmení a pravděpodobně by zahynulo bez možnosti rozmnožit se (Kazimírová & Štibrániová, 2013).

Sliny obsahují velké množství různých proteinů, které mají anti-hemostatický účinek. Tyto proteiny inhibují koagulaci, potlačují agregaci krevních destiček či mají vasodilatační účinek. Příkladem mohou být inhibitory serinové proteázy, které cílí na proteázy koagulační kaskády (Chmelař et al., 2012).

#### Vliv na imunitní systém hostitele

Další obranný mechanismus, který klíště během sání překonává, je imunitní systém (IS) hostitele. Sliny obsahují řadu molekul, které jsou schopné ovlivnit jak nespecifickou (přírozenou), tak specifickou (získanou) imunitní odpověď hostitele. Vliv slin na IS hostitele je velice širokou problematikou, která však není cílem této práce. Z tohoto důvodu bude tomuto tématu věnována pouze obecná kapitola s jednou podkapitolou o makrofázích.

Přírozená imunitní odpověď spolu s komplementem je první linií obrany hostitele v reakci na přisátí klíštěte. Inhibice alternativní cesty aktivace komplementu je jedním ze způsobů, kterým sliny moduluji imunitní mechanismy hostitele (Lawrie et al., 1999). Nyní je známá celá řada proteinů, které se této inhibice účastní. U klíštěte *Ixodes ricinus* jsou to například proteiny IRAC-I a IRAC-II (Daix et al., 2007).

Krátce po přichycení patogenu dochází k aktivaci buněk přírozené složky imunity. Tyto buňky se nacházejí přímo v kůži a jako první přicházejí do kontaktu se sacím ústrojím klíštěte. Jedná se o mastocyty, eozinofily, dendritické buňky, makrofágy a také o keratinocyty. Jejich aktivací dochází k produkci prozánětlivých chemokinů a cytokinů, které navádějí zánětlivé buňky včetně neutrofilů do místa přichycení klíštěte (Francischetti et al., 2009).

Bylo dokázáno, že sliny obsahují řadu bioaktivních molekul, které moduluji funkci všech buněk podílejících se na přírozené imunitní odpovědi hostitele. Sliny či extrakt slinných žláz (SGE) dokáží inhibovat jejich proliferaci, maturaci, migraci a schopnost fagocytózy. Dále mají vliv jak na produkci široké škály cytokinů a chemokinů, tak na expresi různých receptorů (shrnutí v Kotál et al., 2015).

Sání klíštěte indukuje také specifickou imunitní odpověď, která je rovněž klíštěcími slinami modulována (Kotál et al., 2015). Obě složky imunitního systému hostitele fungují v úzké spolupráci: buňky přírozené imunitní odpovědi, jako jsou například makrofágy nebo dendritické buňky, rozpoznávají antigeny a následně je prezentují T a B lymfocytům, které

vytvářejí specifickou imunitní odpověď (Medzhitov & Janeway, 1997). Tuto provázanost obou složek IS je možné vysledovat i v modulaci IS hostitele slinami klíštěte.

Literatura obsahuje značné množství publikací diskutujících vliv slin na T a B lymfocyty. Bylo prokázáno, že sliny či SGE inhibují proliferaci T i B buněk. Dále byl dokázán vliv na produkci cytokinů (IL-2, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ ) T buňkami a protilátek B buňkami (shrnutí v Kotál et al., 2015).

#### Vliv slin na makrofágy

Makrofágy jsou antigen-prezentujícími buňkami, které hrají klíčovou roli v obranných mechanismech hostitele namířených jak proti antigenům vektoru, tak proti klíštětem přenášeným patogenům. Řada publikací se z těchto důvodů zabývá vlivem slin na patogenem stimulované makrofágy.

Vliv SGE z klíštěte *Ixodes ricinus* byl sledován v myších makrofázích stimulovaných bakterií *Borrelia afzelii*. Ukázalo se, že SGE snižuje nejen produkci superoxidu a oxidu dusného, ale také schopnost makrofágů bakterii likvidovat (Kuthejlová et al., 2001). Dále bylo zjištěno, že SGE snižuje jak počet fagocytujících buněk a fagocytovaných bakterií, tak produkci cytokinu TNF- $\alpha$ . Snížení této produkce bylo pozorované také u slin (Kýčková & Kopecký 2006).

V myší linii makrofágů IC-21 byl studovaný vliv slin z klíštěte *Demacantor variabilis* na řadu faktorů. Bylo zjištěno, že sliny podporují migraci makrofágů, ale zároveň redukuje jejich schopnost fagocytózy. Rovněž byl pozorován pozitivní vliv na produkci protizánětlivých Th2 specifických cytokinů IL-4 a IL10 (Kramer et al., 2011).

Dále se ukázalo, že sliny klíštěte *Ixodes scapularis* inhibují produkci TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-12p40 v myších makrofázích stimulovaných lipopolysacharidem nebo bakterií *Anaplasma phagocytophilum* (Chen et al., 2012).

Sliny pocházející z klíštěte *Rhipicephalus microplus* mají vliv na expresi kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 a CD69 v lipopolysacharidem stimulovaných makrofázích skotu. Obdobně byl efekt zvýšené exprese molekuly CD86 sledován v myší linii makrofágů RAW 264.7 (Brake et al. 2010; Brake & de León 2012).

#### Vliv slin na přenos patogenů včetně VKE

Klíštěcí sliny nejsou pouze médiem, prostřednictvím kterého jsou patogeny mezi vektorem a hostitelem přenášeny, ale samy tomuto přenosu napomáhají. Hovoří se o slinami asistovanému přenosu (SAT) (Nutall, 2019b). SAT je uskutečněn díky bioaktivním molekulám, které jsou

ve slinách obsaženy a které mají vliv na hostitele. Jednotlivé SAT faktory se liší napříč různými druhy patogenů a jejich přenašečů (Nutall & Labuda, 2008).

Vliv SGE na přenos VKE byl nejdříve pozorován na neinfekčních nymfách klíšťat rodu *Dermacentor* sajících na morčatech, která nebyla viremická. Do morčat byl inokulován TBEV spolu s SGE pocházejícího z neinfikovaných dospělých samic *Dermacentor marginatus*, které sály po dobu 5 dnů. Ukázalo se, že SGE zvyšuje počet nymf, které se během sání virem infikovaly (Alekseev et al., 1991). Obdobné výsledky byly zaznamenány i u klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* s použitím SGE ze samic *I. ricinus* (Labuda et al., 1993).

Dále byl pozorován vliv SAT na přenos Thogoto viru (Jones et al., 1989), spirochét *B. burgdorferi* (Zeidner et al., 2002; Macháčková et al., 2006) či rychlost proliferace bakterie *Francisella tularensis* v hostiteli (Kročová et al., 2003).

### **1.3.3 Iristatin**

Nedávný pokrok ve výzkumu transkriptomu ukázal, že ve slinných žlázách klíšťat je během sání syntetizováno i více jak 500 různých proteinů a peptidů (Nutall, 2019a). Avšak z tohoto velkého množství proteinů byla jen malá část popsána a pouze u zlomku byla domnělá funkce potvrzena. Jednou z mnoha skupin proteinů obsažených ve slinách jsou inhibitory proteáz, které je možné na základě struktury rozdělit do několika podskupin: proteiny obsahující Kunitzovu doménu, serpiny, cystatiny a další (Francischetti et al., 2009).

V roce 2019 byl popsán Iristatin, inhibitor proteáz patřící do skupiny cystatinů typu 2 (Kotál et al., 2019). Prvními popsány inhibitory cystatinů typu 2 byly sialostatiny pocházející ze slinných žláz klíštěte *Ixodes scapularis*, které jsou schopné inhibovat některé katepsiny či ovlivňovat produkci cytokinů imunitními buňkami (Schwarz et al., 2012). Například sialostatin L potlačuje katepsiny C, L, S, V, X a papain, dále má vliv na cytokinovou produkci lymfocytů, dendritických buněk a mastocytů. V neposlední řadě narušuje proliferaci T buněk (Sá-Nunes et al., 2009; Kotsyfakis et al., 2006).

Iristatin je jedním z cystatinů 2. typu produkovaných ve slinných žlázách klíšťat rodu *Ixodes*. Ukázalo se, že míra exprese mRNA Iristatinu se, obdobně jako i u dalších proteinů, s délkou sání zvyšuje. Dále bylo zjištěno, že Iristatin má schopnost inhibice katepsinů C a L a zároveň snižuje produkci cytokinů Th1 buněk (IFN- $\gamma$  a IL-2), Th2 buněk (IL-4), Th9 buněk (IL-2 a IL-9) a mastocytů (IL-9 a IL-6). Tento cystatin také potlačuje proliferaci T buněk a snižuje příliv imunitních buněk (např. neutrofilů) do místa zánětu. Produkce oxidu dusného v makrofázích se vlivem Iristatinu snížila (Kotál et al., 2019).

## 2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše o vztahu virové infekce, endoplasmatického stresu a imunitní funkce makrofágů/antigen prezentujících buněk
- Optimalizace metod na měření signálních drah aktivovaných stresem na endoplazmatickém retikulu (UPR-unfolded protein responses: ATF6-, IRE1-, PERK-závislá aktivace)
- Stanovení UPR v makrofágové linii PMJ2-R po infekci TBEV
- Otestování vlivu klíčtčích slin na UPR v makrofágové linii PMJ2-R po infekci TBEV

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Buněčná linie

Pro všechny experimenty byla použita myší buněčná linie PMJ2-R (ATCC). Jedná se o peritoneální makrofágy infikované R2 virem, které byly kultivovány při teplotě 37 °C v médiu RPMI 1640 s 10 % bovinního fetálního séra (BOFES; Sigma-Aldrich), 1 % směsi antibiotik (penicilin G – výsledná koncentrace 100 j./ml, streptomycin - výsledná koncentrace 100 µg/ml), 1 % L-glutaminu (výsledná koncentrace 292 µg/ml) a 50 mM 2-merkaptoetanolu (vše Biowest). Buňky byly pasážovány 3x týdně.

#### 3.1.2 Virus klíšťové encefalitidy

Ve všech experimentech byly buňky infikovány virulentním kmenem Hypr (kmen západoevropského subtypu TBEV). Kmen Hypr byl izolován v roce 1953 na Moravě z krve desetiletého chlapce, který byl pozitivně diagnostikován na klíšťovou encefalitidu. Vir byl následně pomnožen Vero buňkách. Titr použitého viru byl ve všech experimentech stejný, tj.  $7 \times 10^7$  PFU/ml.

#### 3.1.3 Klíštěcí sliny

Klíštěcí sliny pocházejí z dospělých samic klíšťat *I. ricinus*, které byly sbírány vlnkovou metodou v okolí města České Budějovice a následně sály na morčeti po dobu 6-7 dnů. Za účelem získání slin byla klíšťata připevněna pomocí oboustranné lepicí pásky k podložním sklíčkům a na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena skleněná kapilára, která byla ke sklíčku připevněna pomocí plastelíny. Slintání bylo podpořeno aplikací 1-2 µl 5% roztoku pilokarpinu (Sigma) v etanolu (Penta) na dorsum každého klíštěte. Klíšťata byla poté ponechána v inkubátoru nastaveném na 37 °C po dobu 2 hodin. Během této doby docházelo k produkci slin do kapilár, jejichž uchycení a naplnění se průběžně kontrolovalo. Vyprodukované sliny byly sesbírány, následně filtrovány přes 0,22 µm filtr (Merc milipore) a uchovávány při teplotě -70 °C.

Stanovení koncentrace proteinů ve slinách bylo provedeno pomocí Bradfordovy metody.

#### 3.1.4 Iristatin

Rekombinantní cystatin Iristatin byl k experimentům získán na základě spolupráce Katedry medicínské biologie s Laboratoří genomiky a proteomiky vektorů na Parazitickém ústavu AV ČR. Iristatin byl přečištěn od lipopolysacharidů firmou ARVYS Proteins (USA) a uchováván při teplotě -70 °C.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava a infekce buněk

#### *Příprava buněk*

PMJ2-R buňky byly proudem média uvolněny ze dna kultivační lahve a následně spočítány v Bürkerově komůrce. Buňky v médiu byly poté centrifugovány v centrifugační zkumavce při 250 g po dobu 2 minut. Následně byl vzniklý pelet resuspendován v kompletním kultivačním RPMI médiu a vzniklá suspenze buněk byla rozdělena do jednotlivých mikrozkuvek.

V případě sledování vlivu klíštěcích slin byly buňky preinkubovány se slinami (výsl. konc. 10 µg/ml) po dobu 1,5 hodiny při teplotě 37 °C. V případě sledování vlivu G1 byly buňky preinkubovány s G1 (výsl. konc. 6 µM) taktéž po dobu 1,5 hodiny a při teplotě 37 °C. Preinkubace probíhala v mikrozkuvkách. Skupiny buněk bez slin a bez G1 byly po tuto dobu také uchovávány při teplotě 37 °C.

Celkový počet takto připravených mikrozkuvek s buňkami odpovídal počtu 6 sledovaných skupin: buňky neinfikované, neinfikované preinkubované s G1, neinfikované preinkubované se slinami, infikované, infikované preinkubované s G1 a infikované preinkubované se slinami.

#### *Infekce buněk*

Připravené buňky byly následně infikované přidáním viru Hypr v množství MOI = 2 (tzn. 2 virové částice na 1 buňku). Přidáním viru se koncentrace slin a G1 snížila, proto byly jejich koncentrace dorovnány odpovídajícím množstvím slin a G1. Inkubace buněk s virem probíhala po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. K neinfikovaným buňkám bylo místo viru přidáno stejné množství kontrolního média a opět byly koncentrace slin a G1 dorovnány na počáteční hodnoty.

Po skončení inkubace byly buňky 2x promyty 1 mililitrem média od nenavázaných virových částic centrifugací (5 minut, 250g, 4 °C). Poté byl vzniklý pelet resuspendován v potřebném množství média tak, aby 100 µl buněčné suspenze obsahovalo  $1 \times 10^6$  buněk. V případě přípravy buněk pro RNA vzorky byly buňky nasazeny na 24 - jamkový panel, a to v množství  $4 \times 10^5$  buněk pro 24 hodinový interval a v množství  $2 \times 10^5$  buněk pro 96 hodinový interval. Pro získání vzorků určených pro detekci proteinů pomocí metody Western blotu byly buňky nasazeny na 6 - jamkový panel v množství  $2 \times 10^6$  buněk pro 24 hodinový interval a v množství  $1 \times 10^6$  buněk pro 96 hodinový interval.

Ke všem skupinám, které byly preinkubovány se slinami nebo G1, bylo přidáno odpovídající množství G1 a slin (o výsl. konc.: sliny 10 µg/ml, G1 6 µM). Panely byly poté umístěny do



termostatu a inkubovány při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. V intervalech 24 hodin a 96 hodin po infekci (hpi) byly získávány buněčné lyzáty.

### **3.2.2 Příprava proteinových vzorků**

#### Lýza buněk

Po uplynutí časových intervalů bylo z jednotlivých jamek odsáto médium a buňky byly opláchnuty vychlazeným sterilním PBS o objemu 1 mililitru. Odebrané médium bylo stočeno (10 minut, 1500 RPM, 4 °C), po stočení byl odsán supernatant a vzniklý pelet byl resuspendován pomocí z jamek odebraného PBS a opět byly buňky centrifugovány za stejných podmínek.

Následně bylo k buňkám na panelu přidáno 300 µl RIPA pufru (Sigma-Aldrich) s inhibitory (viz dále) a buňky byly lyzovány na ledu po dobu 10 minut. Vzniklým lyzátem byl resuspendován pelet buněk získaný ze stočeného média a PBS a opět probíhala lýza buněk na ledu po dobu 10 minut. Zlyzované buňky byly stočeny (10 minut, 11000 RPM, 4 °C) a supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a uchován v -70 °C až do dalšího použití.

K lýze buněk byl použit komerční RIPA pufr (Sigma-Aldrich), do kterého byl přidán NaF (výsl. kon. 42 µg/ml). Těsně před samotnou lýzou byl k pufru přidán i Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (výsl. kon. 37 µg/ml) a 1x koktejl inhibitorů proteáz Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich).

#### Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích buněčných lyzátů byla změřena s využitím Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) a přístroje Synergy H1 microplate reader (Biotek). Metoda byla provedena v 96 - jamkové destičce se standardní dobou inkubace (tj. 30 minut při teplotě 37 °C) dle protokolu výrobce.

#### Proteinové vzorky tunicamycinem stimulovaných buněk

Pro odlišení nespecifických vazeb protilátky při detekci BiP proteinu (viz dále) bylo využito tunicamycinu (Sigma), který v buňkách indukuje ER stres. PMJ2-R buňky byly v množství 1 x 10<sup>6</sup> buněk inkubovány s tunicamycinem (výsl. kon. 2 µM) po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Kontrolní skupinu představovaly nestimulované buňky, ke kterým byl přidán stejný objem DMSO (Sigma). Po uplynutí časového intervalu byly buňky lyzovány ve 100 µl RIPA pufru s odpovídajícím množstvím inhibitorů.

### **3.2.3 Příprava RNA vzorků**

Lýza buněk a izolace RNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel), všechny použité reagensie kromě etanolu a 2-merkaptoetanolu jsou součástí tohoto kitu. U obou metod se postupovalo dle protokolu od výrobce.

#### Lýza buněk

Po uplynutí časového intervalu bylo z buněk v panelu odsáto médium a následně stočeno v centrifuze (2 minuty, 2000 RPM, 4 °C). K adherovaným buňkám bylo přidáno 350 µl RA1 roztoku s 3,5 µl 2-merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich) a vzniklým lyzátem byly resuspendovány buňky z odebraného a stočeného média. Následně byly mikrozkušavky s lyzátem pečlivě zvortexovány a uchovávány při teplotě -70 °C. Po získání lyzátů z obou časových intervalů byla provedena samotná izolace RNA.

#### Izolace RNA

Lyzáty byly hrubě přefiltrovány nanesením na fialové kolonky a následnou centrifugací (1 minuta, 11 000 g). Poté byl filtrát pečlivě smíchán s 350 µl 70% etanolu (Penta), nanesen na modré filtrační kolonky a centrifugován (30 sekund, 11 000 g), došlo tak k navázání nukleových kyselin na kolonku. Odsolení bylo provedeno pomocí 350 µl MDB pufru a centrifugací (1 minuta, 11 000 g). Následovala inkubace kolonky s 95 µl roztoku rDNasy (vzniklým smícháním 90 µl rDNase pufru s 10 µl rDNasy) po dobu 15 minut. Následně byla kolonka promyta 200 µl RAW2 pufru (centrifugace 30 sekund, 11 000 g), poté pomocí 600 µl RA3 pufru (centrifugace 30 sekund, 11 000 g) a finální promytí bylo provedeno 250 µl RA3 pufru (centrifugace 2 minuty, 11 000 g). Po promytí byla provedena eluce pomocí 60 µl RNA-free vody (centrifugace 1 minuta, 11 000 g) do nuclease-free zkumavky.

Po získání RNA byla změřena její koncentrace a vzorky byly uchovávány při teplotě -70 °C.

#### Měření koncentrace RNA

Koncentrace získaných RNA vzorků byly změřeny pomocí Take3™ Trio Micro-Volume destičky (Biotek) v přístroji Synergy H1 microplate reader (Biotek).

### **3.2.4 Stanovení aktivace ATF-6 dráhy UPR**

Pro stanovení aktivace ATF-6 dráhy UPR byla sledována exprese proteinu BiP metodou Western Blot a exprese genu BiP metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

#### Western Blot

- SDS-PAGE elektroforéza

Nejdříve byl připraven 8% gel pro elektroforetickou separaci proteinů, který se skládá ze separačního (running) a zaostřovacího (stacking) gelu. Složení jednotlivých gelů je vyobrazené v následující tabulce (Tab. I), hodnoty jsou uvedené pro přípravu dvou 8% gelů.

**Tab. I:** Příprava dvou 8% gelu pro SDS-PAGE elektroforézu.

Zaostřovací gel		Separací gel		výrobce
40% Acryl/Bisacryl amid	0,49 ml	40% Acryl/Bisacryl amid	3 ml	VWR
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8	1,25 ml	4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8	3,75 ml	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	H <sub>2</sub> O	8,25 ml	-
10% APS	30 µl	10% APS	60 µl	Sigma-Aldrich
TEMED	6 µl	TEMED	12 µl	WVR

Následující den byla sestavena aparatura pro elektroforézu, do které byly umístěny připravené gely a zality ELFO pufrem (25 mM TRIS, 192 mM Glycine, 1 % SDS). Poté byl vytažen hřebínek a do první jamky každého gelu byl nanesen ELFO marker v množství 5 µl (PageRuler™ Plus Prestain Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific).

Díky získaným hodnotám koncentrací proteinů ve všech vzorcích bylo možné nanášet do jednotlivých jamek v gelu stejné množství proteinů. Vzorky byly proto připraveny v požadovaném množství proteinů a následně doplněny RIPA pufrem do objemu 30 µl a smíchány s LB pufrem (připravený smícháním 900 µl 4x Laemmli Sample Buffer [Biorad] se 100 µl merkptoetanolu [Sigma-Aldrich]) v poměru 3:1 ve prospěch vzorku. Takto připravené vzorky byly inkubovány 3 minuty při 95 °C a následně pipetovány do jednotlivých jamek gelu. Elektroforetická separace proteinů probíhala při nastavených hodnotách 80 mA a 250 V (pro 2 gely) po dobu přibližně 50 minut.

- Blotování

Následujícím krokem byl přenos rozdělených proteinů z gelu na PVDF membránu (Thermo Fisher Scientific). Gely byly vyjmuty z aparatury a přemístěny do Transfer pufru (25,6 mM TRIS, 192 mM glycin, 1,73 mM SDS, 20 % metanol). Na blotovací aparatuře byl složen tzv. „sandwich“, který vznikl složením těchto vrstev na sebe: 3 filtrační papíry – PVDF membrána – gel – 3 filtrační papíry. Membrána byla předtím aktivovaná metanolem (WVR) a následně navlhčena, stejně jako filtrační papíry, v Transfer pufru. Přenos proteinů probíhal při nastavených hodnotách 126 mA a 300 V (pro dva gely) přibližně 1,5 hodiny.

Po přenesení proteinů byly membrány promyty roztokem TBS (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,6) s 0,1 % Tweenem (Sigma-Aldrich) a následně byla membrána vysycovaná v roztoku 5 % odtučněného mléka (Basic Nutrition) v TBS s 0,1 % Tweenem po dobu 1 hodiny.

- Aplikace protilátek

Po vyblokování membrány mlékem byla membrána zatavená ve fólii inkubována přes noc s primární králičí protilátkou proti BiPu (78 kDa, Cell Signalling Technology). Primární protilátka byla ředěna v 5 % roztoku mléka v TBS s 0,1 % Tweenem v poměru 1:1000. Inkubace probíhala přes noc v chladové místnosti o teplotě cca 4 °C.

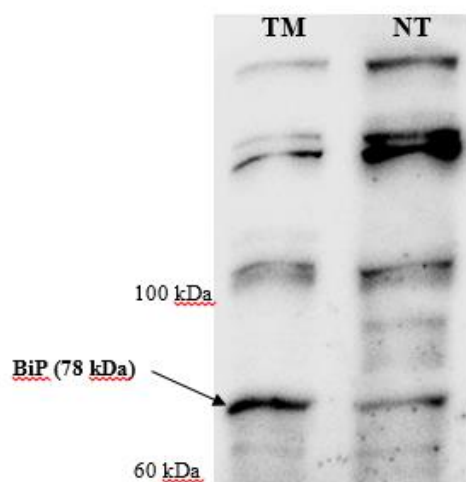
Po uplynutí doby inkubace byla membrána promyta v TBS s 0,1% Tweenem (2 x rychle, poté 1 x 15 minut a 2 x 5 minut na třepačce). Následovala inkubace v pokojové teplotě se sekundární proti-králičí protilátkou (anti-rabbit IgG, HRP linked, Cell Signalling Technology) v ředění 1:2000. Na tuto sekundární protilátku je navázána avidin-peroxidáza, díky které je možné proteiny detekovat na základě chemiluminiscence. Inkubace probíhala 45 minut a poté byla membrána opět promyta v TBS s 0,1 % Tweenem (3 x 5 minut).

- Detekce proteinů

Pro detekci proteinů byly použity roztoky WesternBright™ Quantum (Advansta). Směs roztoků působila na membráně přibližně jednu minutu a poté byla v detekčním přístroji (Alliance 47, Uvitec Cambridge) změřena chemiluminiscence. Intenzita chemiluminiscence v jednotlivých vzorcích byla vyhodnocena v programu ImageJ .

Referenčním proteinem byl  $\beta$ -aktin (králičí protilátka proti  $\beta$ -aktinu, 45 kDa ředění 1:1000, Cell Signalling Technology), pro jehož detekci nebylo nutné membránu stripovat. Po kvantifikaci proteinů v jednotlivých vzorcích pomocí programu ImageJ bylo relativní množství BiP proteinu vyhodnoceno jako poměr množství proteinu BiP ku  $\beta$ -aktinu.

Jelikož se při detekci proteinu BiP ukázalo, že protilátka se váže i nespecificky a dochází tak k detekci nespecifických bendů na membráně, bylo nutné odlišit specifický bend od těch nespecifických. Toho bylo docíleno detekcí proteinu BiP ve vzorku získaném stimulací buněk tunicamycinem. Detekce proteinu BiP v tunicamycinem stimulovaných buňkách v porovnání s kontrolní skupinou je vyobrazena na následujícím obrázku (Obr. 4).



**Obr. 4:** Detekce BiP proteinu v Tunicamycinem (TM) stimulovaných buňkách.

U tunicamycinem stimulované skupiny (TM) byl v místě odpovídající velikosti BiP proteinu (78 kDa) pozorován zřetelný bend. U nestimulované skupiny (NT) byl tento bend o poznání slabší.

*Kvantitativní polymerázová řetězová reakce*

Pro stanovení změny exprese mRNA genu BiP bylo využito metody qPCR, avšak nejdříve bylo nutné přepsat vyizolovanou RNA do komplementární DNA (cDNA).

- Příprava cDNA

cDNA byla připravena pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Reakce byla provedena dle protokolu od výrobce, objem reakce byl 20  $\mu$ l. Složení reakční směsi je vyobrazeno v následující tabulce (Tab. II).

**Tab. II:** Složení reakční směsi pro transkripci RNA do cDNA, množství odpovídá 1 reakci.

RNA	1 $\mu$ g
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	doplnit objem 1 $\mu$ g RNA do 12 $\mu$ l
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1 $\mu$ l
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 $\mu$ l
Protector RNase Inhibitor	0,5 $\mu$ l
Deoxynucleotide Mix	2 $\mu$ l
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 $\mu$ l

Kromě transkripce vzorků RNA byl připraven také vzorek sloužící jako negativní kontrola. Transkripce probíhala v přístroji (Biometra Tone, Analytik Jena) s následujícím nastavením: 30 minut při 55 °C, poté 5 minut při 85 °C.

- qPCR

qPCR byla provedena v reakční směsi o objemu 10 µl pomocí JumpStart Taq Ready Mixu (Sigma-Aldrich) a sondami značených primerů pro BiP (ID: 1743334, Applied Biosystems) a pro referenční gen GAPDH (ID: 1832420, Applied Biosystems). Přesné složení reakční směsi znázorňuje následující tabulka (Tab. III). Každá reakce byla provedena v duplikátech.

**Tab. III:** Složení reakční směsi pro qPCR (BiP).

JumpStart Taq Ready Mix	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,4 µl
Primery + sonda	0,5 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	2,1 µl
cDNA	1 µl

Amplifikace poté probíhala v přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research), který byl nastaven dle následující tabulky (Tab. IV).

**Tab. IV:** Nastavení parametrů qPCR (BiP).

krok	teplota	trvání	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	2 min	-
denaturace	94 °C	15 s	40x
nasednutí primerů	60 °C	60 s	

Výsledná relativní hodnota exprese mRNA byla vypočítána podle vzorce:  $2^{-\Delta\Delta C_t} = [(C_t \text{ genu BiP} - C_t \text{ referenčního genu (GADPH) u stimulovaného vzorku} - (C_t \text{ genu BiP} - C_t \text{ referenčního genu (GADPH) kontrolního nestimulovaného vzorku})]$ , kdy hodnota  $C_t$  představuje cyklus, při kterém fluorescenční signál překročil práh detekce, tzv. threshold.

### 3.2.5 Stanovení aktivace PERK dráhy UPR

PERK dráha UPR byla detekovaná prostřednictvím detekce fosforylované formy proteinu eIF2 $\alpha$ , a to pomocí metody Western blot.

Postup při detekci P-eIF2 $\alpha$  (králičí protilátka P-eIF2 $\alpha$ , 38 kDa, Cell Signalling Technology) byl stejný jako u detekce proteinu BiP, ale s tím rozdílem, že referenčním proteinem byla nefosforylovaná forma tohoto proteinu. Jelikož se jednalo o stejně velké proteiny, byla nejdříve detekovaná fosforylovaná forma a až po stripování membrány (tj. odstranění již navázaných protilátek) mohlo dojít k inkubaci s další primární protilátkou (králičí protilátka proti eIF2 $\alpha$ , 38 kDa, Cell Signalling Technology).

- Stripování membrány

Pro stripování membrány byl použit pufr Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific), ve kterém byla membrána inkubovaná (na třepačce) při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Následně došlo k promytí v TBS pufru s 0,1 % Tweenem, k opětovnému vysycení membrány mlékem a k inkubaci s primární protilátkou.

### **3.2.6 Stanovení aktivace IRE-1 dráhy UPR**

Aktivace IRE-1 dráhy byla sledována prostřednictvím detekce sestřihu mRNA XBP1. Pro tento účel bylo využito metody PCR s následnou vizualizací PCR produktů na agarozovém gelu. Pro tuto metodu byly použity celkem dvě sady primerů, jejichž sekvence byly vyhledány v literatuře. Optimální teplota pro nasedání primerů byla nejdříve zjištěna pomocí gradientové PCR.

Primery pro XBP1 (Generi Biotech) převzaté z Wang et al., 2015:

Forward: 5' – ACGAGGTTCCAGAGGTGGAG – 3'

Reverse: 5' – AAGAGGCAACAGTGTCAGAG – 3'

PCR produkty o velikosti 161 a 135 bp

Primery pro XBP1 (Generi Biotech) převzaté z Sha et al., 2009.

Forward: 5' – AGTTAAGAACACGCTTGGGAAT – 3'

Reverse: 5' – AAGATGTTCTGGGGAGGTGAC – 3'

PCR produkty o velikosti 172 a 146 bp

#### Gradientová PCR

Gradientová PCR byla provedena s jedním vybraným vzorkem cDNA v reakční směsi PCR Master Mixu (Thermo Fisher Scientific), PCR vody a primerů (viz Tab. V), objem reakce byl 15  $\mu$ l. Zvolené teploty gradientu byly následující: 50,5 °C, 53 °C, 56 °C, 58,5 °C a 60,3 °C.

**Tab. V:** Složení reakční směsi pro gradientovou PCR, množství odpovídá přípravě 5 reakcí.

2x PCR Master Mix	40 µl
PCR voda	30 µl
Forward primer	4 µl
Reverse primer	4 µl
cDNA	2 µl

Následně byla reakční směs rozdělena v objemu 15 µl do jednotlivých zkumavek. PCR reakce probíhala v přístroji Biometra Tone (Analytik Jena), jehož nastavení znázorňuje další tabulka (Tab. VI).

**Tab. VI:** Nastavení parametrů gradientové PCR reakce.

<b>krok</b>	<b>teplota</b>	<b>trvání</b>	<b>počet cyklů</b>
počáteční denaturace	98 °C	30 s	1
denaturace	98 °C	10 s	40
nasednutí primerů	gradient	30 s	
extenze	72 °C	60 s	
finální extenze	72 °C	10 minut	1

#### Vizualizace PCR produktů na agarozovém gelu

Po provedení PCR reakce byly PCR produkty vizualizovány na 2,5 % agarozovém gelu, který byl připraven rozpuštěním 1,75 g agarosy (Amresco) v 70 ml TAE (připravený naředěním 50x koncentrovaného TAE, Envisan-Gem). Následně byl gel barven pomocí Syber Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).

Do jamek připraveného gelu byl nanášen DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) a vzorky, které byly smíchány s nanášecí barvičkou (DNA Gel Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) v poměru 5:1 v prospěch vzorku. Elektroforetická separace PCR produktů v gelu probíhala při nastavení zdroje na 100 mA a 150 V. Po odpojení zdroje byly amplifikované PCR fragmenty vizualizovány v detekčním přístroji a poté byla vybrána vhodná teplota nasedání primerů.



### PCR

Po zjištění vhodné teploty nasedání použitých primerů byla provedena PCR reakce u všech vzorků, ale s již pevně danou teplotou nasedání primerů – u obou sad primeru byla optimální teplota stanovena na 56 °C. Objem reakční směsi byl 20 µl (viz Tab. VII). Po amplifikaci PCR produktů došlo k jejich elektroforetické separaci a vizualizaci na gelu.

**Tab. VII:** Složení reakční směsi pro PCR.

2x PCR Master Mix	10µl
PCR voda	7 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
cDNA	1 µl

### Vyhodnocení mRNA sestřihu

Pro vyhodnocení byly získány hodnoty intenzity fluorescenčního signálu obou PCR fragmentů v každém vzorku pomocí programu ImageJ. Stupeň aktivace IRE-1 dráhy byl poté vyhodnocen jako podíl intenzity sestřiženého fragmentu XBP1s (XBP1 spliced) a součtu intenzity fragmentů XBP1u (XBP1 unspliced) a XBP1s.

### **3.2.7 Expres virové mRNA**

K určení změny exprese virové mRNA ve sledovaných skupinách byla provedena jednokroková qPCR pomocí Kapa Sybr Fast Universal One-step qRT-PCR Kit (Sigma-Aldrich). Množství jednotlivých komponentů v reakční směsi je uvedeno v Tabulce VIII. K detekci virové RNA byly použity následující primery (vše Generi Biotech):

Primery pro VKE:

Forward: 5'– GCAGCCAGATGCCCAACAATGG – 3'

Reverse: 5'– TCTTTTTTGCCTCACAAGCCGCCT – 3'

Primery pro GADPH (kontrolní gen):

Forward: 5'– TGTGTCCGTCGTGGATCTGA – 3'

Reverse: 5'– TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG – 3'

**Tab. VIII:** Složení reakční směsi pro qRT-PCR.

2x Kapa Sybr Fast Master Mix	5 $\mu$ l
forward primer	0,2 $\mu$ l
reverse primer	0,2 $\mu$ l
50x Kapa RT Mix	0,2 $\mu$ l
PCR voda	1,4 $\mu$ l
RNA	3 $\mu$ l

Vstupní koncentrace RNA, která byla přidána do reakční směsi, byla 2 ng/ $\mu$ l. Pro tyto účely byla vyizolovaná RNA do požadované koncentrace zředěna pomocí PCR vody. Reakce probíhala v přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research), který byl nastaven dle následující tabulky (Tab. IX).

**Tab. IX:** Nastavení parametrů qRT-PCR reakce.

krok	teplota	trvání	počet cyklů
Reverzní transkripce	42 °C	10 min	1
počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
denaturace	95 °C	5 s	40x
nasednutí primerů	60 °C	30 s	

Expres virové mRNA byla vyhodnocena stejným způsobem jako exprese BiPu pomocí  $C_t$  hodnot.

### 3.2.8 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5 pomocí dvoucestné ANOVY s využitím Benferroniho post hoc testu. Výsledky jsou prezentované v grafech jako aritmetické průměry ze stanovených hodnot a chybové úsečky v grafech představují střední chybu průměru (SEM). Statisticky významné rozdíly jsou v grafech označeny hvězdičkami (\* pro  $p < 0,05$ , \*\* pro  $p < 0,01$ , \*\*\* pro  $p < 0,001$ ).

## 4 VÝSLEDKY

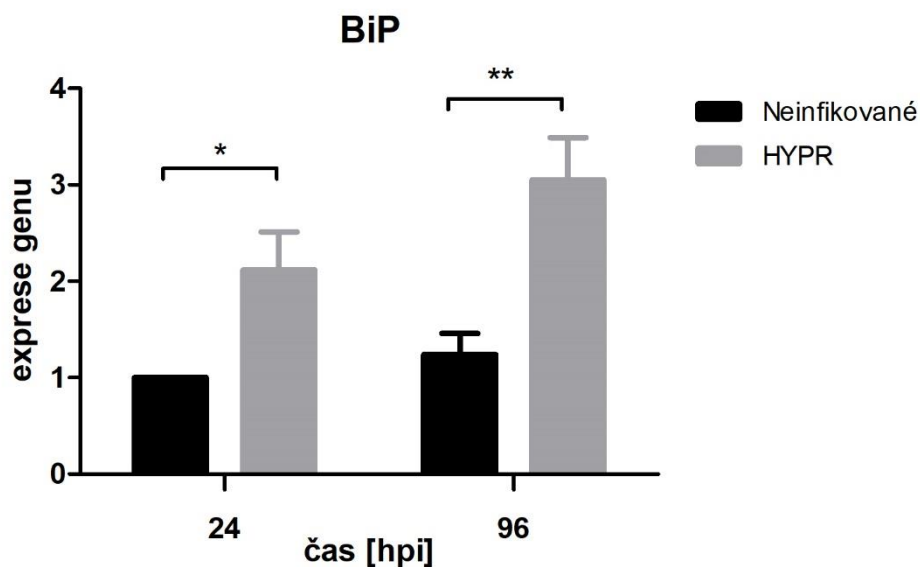
Výsledky jsou strukturované do 4 samostatných částí. První se zabývá stanovením UPR ve virem infikovaných buňkách, další vlivem klíčících slin a G1 na aktivaci UPR a poslední část je věnovaná vlivu slin a G1 na replikaci viru v infikovaných buňkách.

### 4.1 Stanovení UPR ve virem infikovaných buňkách

Aktivace UPR ve virem infikovaných buňkách byla analyzována pro všechny tři dráhy: ATF-6, PERK a IRE-1. PMJ2-R buňky byly infikovány virem HYPR (MOI=2) a následně byly lyzovány v intervalech 24 a 96 hpi. Analýza proteinů byla provedena metodou Western blot, analýza exprese genů pomocí qPCR a analýza mRNA sestřihu metodou PCR. Kontrolní skupinou byly neinfikované buňky v časovém intervalu 24 hpi, kterým byla při zpracování získaných dat přiřazena hodnota 1. Všechny uvedené experimenty byly provedeny třikrát.

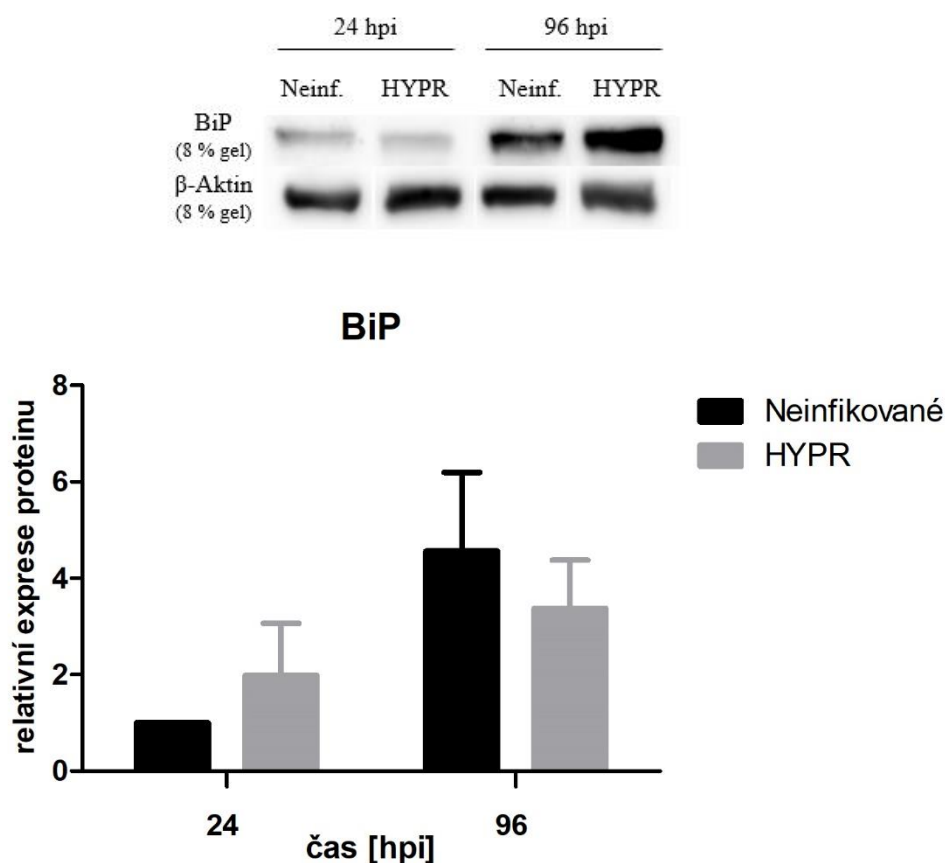
#### ATF-6 dráha

Aktivace ATF-6 dráhy byla analyzována prostřednictvím detekce exprese genu BiP a exprese příslušného proteinu. Exprese genu BiP byla vyhodnocena ze tří experimentů a zároveň byla každá qPCR reakce prováděna v duplikátech. Na následujícím obrázku (Obr. 4) jsou uvedené výsledky této analýzy, ze kterých vyplývá, že infekce indukuje expresi genu BiP v obou časových intervalech. V čase 24 hpi byla exprese genu v infikovaných buňkách 2,11 - krát zvýšena oproti expresi v neinfikovaných buňkách. V případě 96 hpi bylo sledováno 2,45 násobné zvýšení exprese. Pozorovaný rozdíl mezi infikovanými a neinfikovanými buňkami byl signifikantní.



**Obr. 4:** Expze genu BiP v PMJ2-R buňkách infikovaných virem Hypr.

Expze proteinu BiP v neinfikovaných a infikovaných buňkách byla vyhodnocena jako podíl expze proteinu BiP a  $\beta$ -aktinu. Expze proteinu se v jednotlivých časových intervalech lišila, výsledky však nejsou statisticky signifikantní. Výsledky analýzy expze BiP proteinu jsou uvedené na následujícím obrázku. (Obr. 5). V prvním časovém intervalu došlo téměř k dvojnásobnému zvýšení expze proteinu vlivem infekce, ale v intervalu 96 hpi bylo sledováno snížení expze tohoto proteinu. Dále byl pozorován rozdíl v expzi proteinu v neinfikovaných buňkách mezi jednotlivými časovými intervaly: v intervalu 96 hpi bylo detekováno 4,56 - násobné zvýšení expze oproti intervalu 24 hpi.

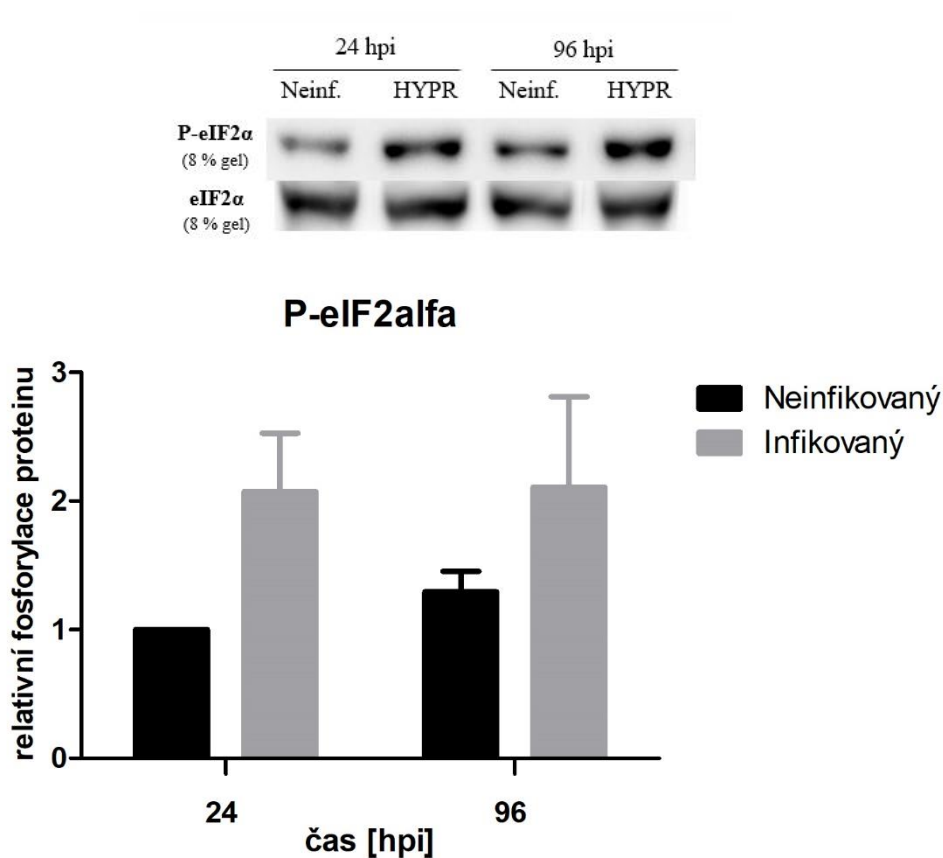


**Obr. 5:** Relativní expze proteinu BiP v infikovaných buňkách.

#### PERK dráha

Aktivace PERK dráhy v infikovaných buňkách byla analyzována jako míra relativní fosforylace proteinu eIF2 $\alpha$  prostřednictvím Western Blotu. Výsledná hodnota expze byla získána jako podíl expze fosforylované a nefosforylované (totální) formy proteinu eIF2 $\alpha$ . Z grafu (Obr. 6) je možné odečíst, že fosforylace eIF2 $\alpha$  byla zvýšená v buňkách infikovaných

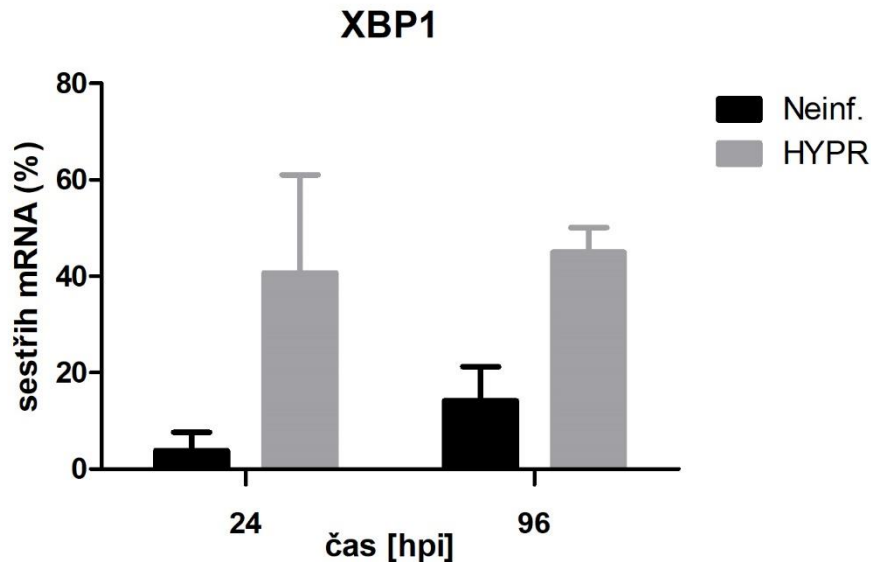
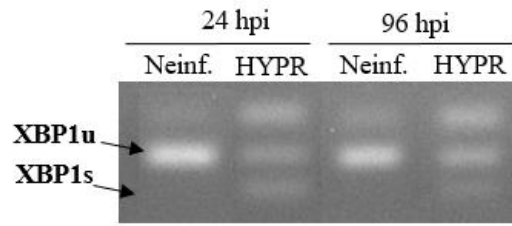
virem, a to v obou časových intervalech. V intervalu 24 hpi došlo k dvojnásobnému nárůstu fosforylované formy proteinu. V případě tohoto proteinu nebyl u neinfikovaných buněk pozorován téměř žádný rozdíl mezi časovými intervaly. Výsledky však opět nebyly signifikantní.



**Obr. 6:** Relativní fosforylace proteinu eIF2 $\alpha$  v infikovaných buňkách.

Aktivace IRE-1 dráhy byla stanovena detekcí mRNA sestřihu pomocí metody PCR a následné vizualizace vzniklých PCR produktů na agarozovém gelu. Stupeň aktivace IRE-1 dráhy byl poté vyjádřen jako podíl intenzity fluorescenčního signálu sestřiženého fragmentu XBP1s a součtu intenzity fragmentů XBP1u a XBP1s. Při vizualizaci PCR produktů byl detekován ještě jeden neznámý produkt PCR reakce, jedná se o bend velikosti cca 200 pb. Tento bend byl pozorován u obou sad primerů.

Výsledky, které nebyly signifikantní, znázorňuje obrázek níže (Obr. 7). Z grafu je patrné, že v infikovaných buňkách byl detekovaný nárůst sestřihu mRNA. Na druhou stranu v neinfikovaných buňkách nebyl detekovaný žádný sestřih mRNA nebo jen v malé míře.



**Obr. 7:** Sestřih mRNA XBP1 v buňkách infikovaných virem Hypr.

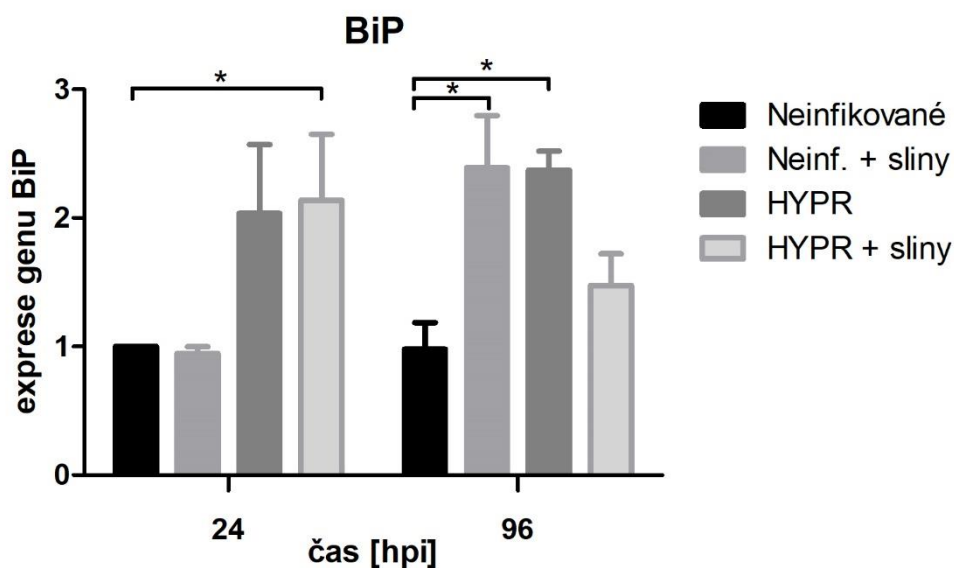
## 4.2 Vliv klíčtějších slin na aktivaci UPR

Pro sledování vlivu slin na aktivaci jednotlivých drah UPR byly buňky preinkubovány se slinami (výsl. kon. 10 µg/ml), poté následovala infekce virem Hypr (MOI=2). Do experimentů byla zahrnuta i skupina neinfikovaných buněk preinkubovaných se slinami, díky které bylo možné zjistit, zda nemají samotné sliny vliv na aktivaci jednotlivých drah UPR. Vzorky byly získávány v čase 24 a 96 hpi. Uvedené výsledky byly získány zpracováním dat ze dvou experimentů.

### ATF-6 dráha

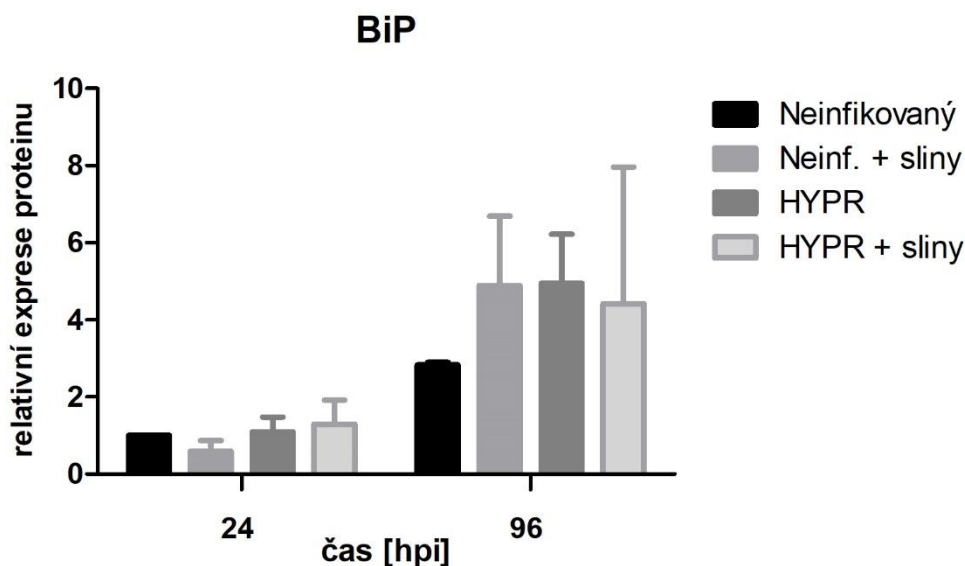
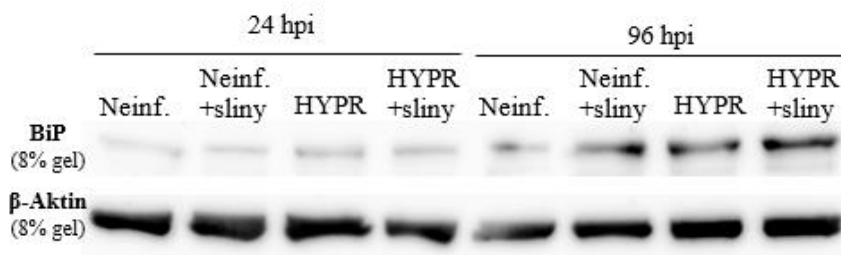
Z grafu (Obr. 8) je možné odečíst, že v intervalu 24 hpi neměly sliny žádný vliv na expresi genu v neinfikovaných buňkách. Oproti tomu v časovém intervalu 96 hpi byla zaznamenána zvýšená exprese genu v neinfikovaných buňkách, která byla signifikantní. Z toho plyne, že samotné sliny byly schopné během 96 hodin inkubace s buňkami indukovat expresi BiPu na úrovni RNA. Toto zvýšení exprese slinami bylo dokonce srovnatelné se změnou exprese, která nastala vlivem virové infekce.

V infikovaných buňkách sliny neměly žádný vliv na expresi genu v prvním časovém intervalu, ale v případě druhého časového intervalu došlo vlivem slin ke snížení exprese. Toto snížení však nebylo statisticky průkazné.



**Obr. 8:** Vliv klíččích slin na expresi genu BiP.

Tato dráha byla analyzována také na úrovni proteinů. Z grafu (Obr. 9) je patrné, že v prvním časovém intervalu nedošlo k žádné změně v expresi proteinu mezi sledovanými skupinami. V druhém časovém intervalu byla vlivem samotných slin opět sledovaná zvýšená exprese proteinu. Nebylo zjištěno, že by sliny měly nějaký vliv na expresi proteinu BiP v infikovaných buňkách.

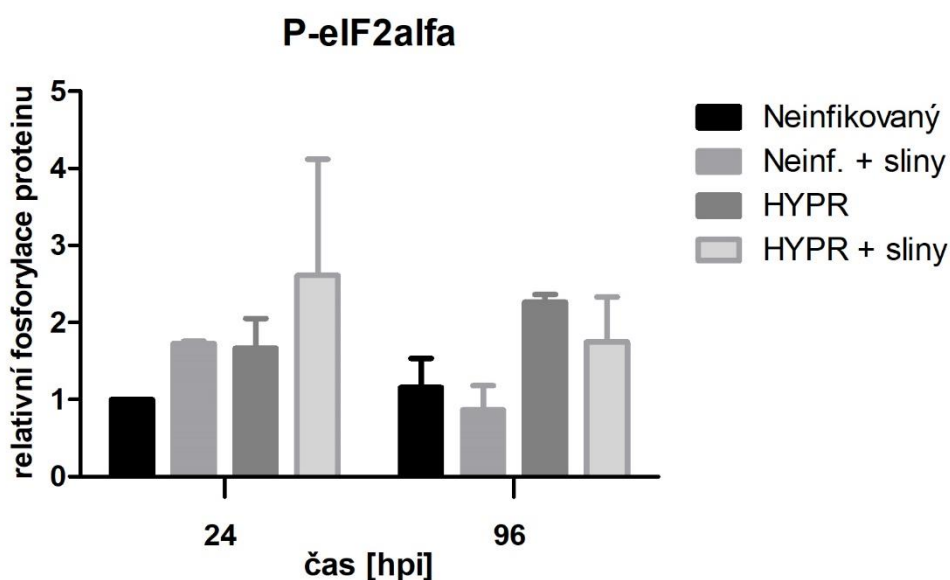
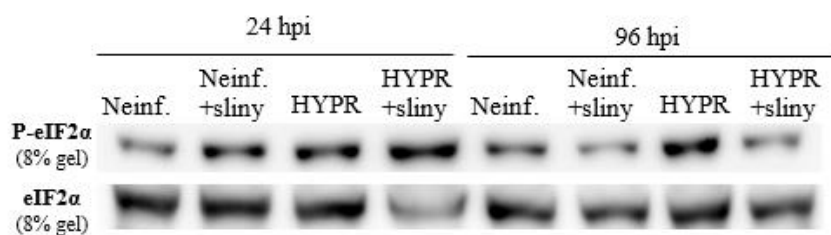


**Obr. 9:** Vliv klíštěcích slin na expresi proteinu BiP.

#### PERK dráha

Vliv slin na aktivaci PERK dráhy byl opět vyhodnocen ze dvou provedených experimentů. Na základě následujícího grafu (Obr. 10) je možné říci, že v intervalu 24 hpi sliny indukují fosforylaci eIF2 $\alpha$  proteinu v jak infikovaných, tak neinfikovaných buňkách. V druhém časovém intervalu nebyla sledována žádná změna ve fosforylaci proteinu, která by byla způsobena slinami.

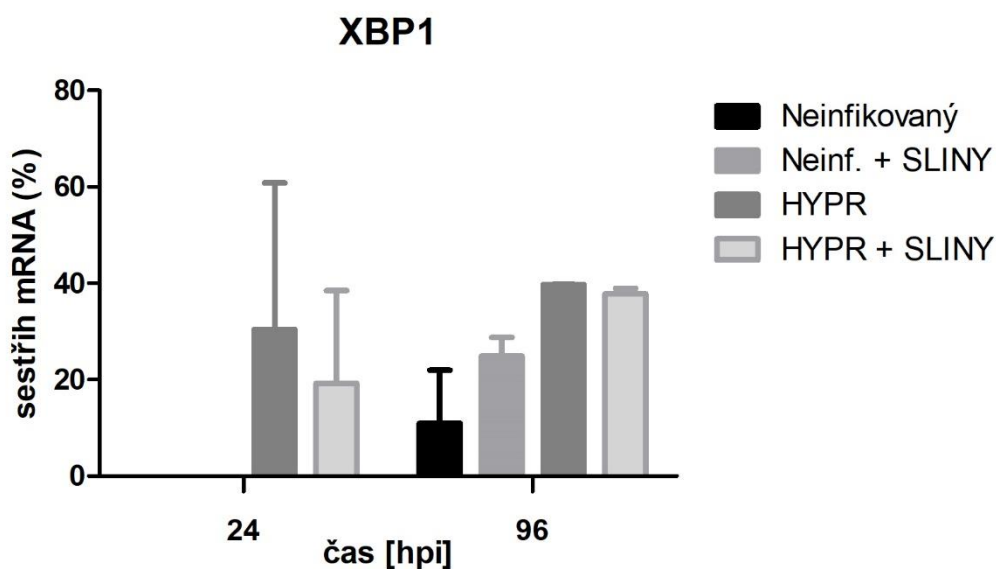
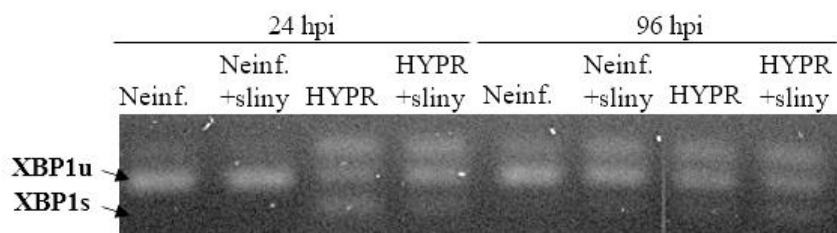




**Obr. 10:** Vliv klíččích slin na fosforylaci proteinu eIF2α.

#### IRE-1 dráha

Vliv slin byl zkoumán i v souvislosti se IRE-1 dráhou UPR. Sestřih mRNA XBP1 byl vyhodnocen celkem ze dvou experimentů, jejichž průměry jsou znázorněné na následujícím obrázku (Obr. 11). Z grafu je patrné, že sestřih mRNA nebyl detekovaný v prvním časovém intervalu u skupiny neinfikovaných buněk a zároveň k jeho indukci nedošlo ani vlivem slin. Samotné sliny zvýšily míru sestřihu v časovém intervalu 96 hpi, ale u infikovaných buněk nedošlo v tomto intervalu k žádné změně v sestřihu mRNA. Snížení míry sestřihu vlivem slin bylo pozorované v infikovaných buňkách v časovém intervalu 24 hpi. Žádné pozorované změny však nejsou statisticky průkazné.



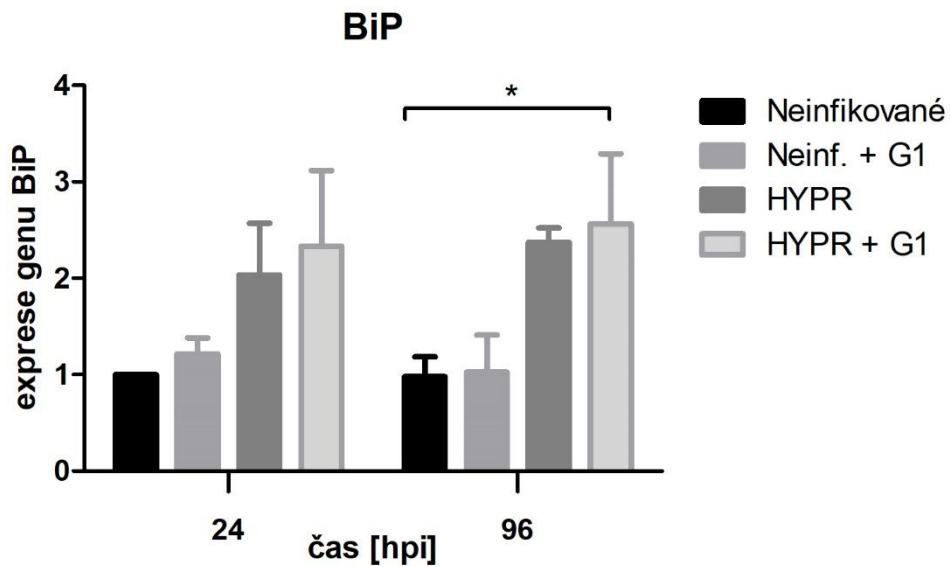
**Obr. 11:** Vliv klíštěcích slin na sestřih mRNA XBP1.

### 4.3 Vliv Iristatinu na aktivaci UPR

Obdobně jako u analýzy vlivu slin na jednotlivé dráhy UPR, byl analyzován také vliv Iristatinu, který je jedním ze známých proteinů obsaženým ve slinách klíštěte. (Kotál et al., 2019) Do experimentů byla také zahrnuta skupina neinfikovaných buněk preinkubovaných s Iristatinem (výsl. kon. 6  $\mu$ M), aby bylo možné vyhodnotit, zda má tento samotný klíštěcí protein vliv na aktivaci jednotlivých drah UPR v PMJ2-R buňkách. Všechna vyhodnocení kromě fosforylace eIF2 $\alpha$  jsou provedena ze dvou experimentů. Iristatin je v grafech označován jako G1.

#### ATF-6 dráha

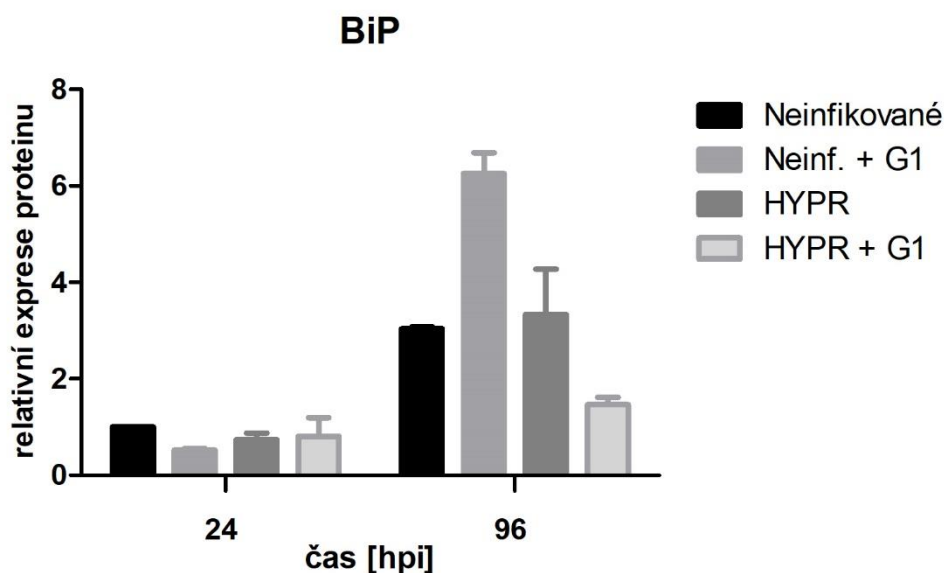
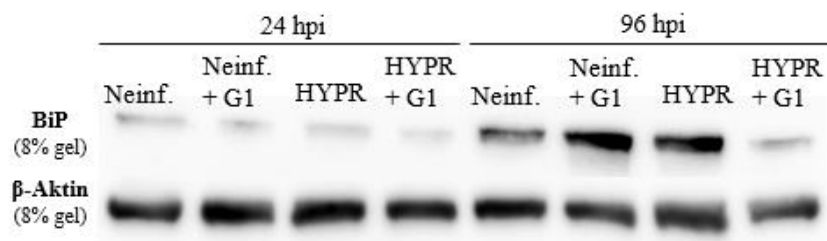
Při pohledu na následující graf (Obr. 12) je patrné, že Iristatin neměl žádný vliv na expresi genu BiP, a to v žádném z časových intervalů. Vliv tohoto proteinu na expresi genu se neprojevil ani v souvislosti s virovou infekcí.



**Obr. 12:** Vliv Iristatinu (G1) na expresi genu BiP.

Při sledování exprese BiP proteinu bylo zjištěno, že Iristatin v čase 24 hpi snižuje expresi proteinu v neinfikovaných buňkách, a to dokonce dokonce na poloviční hodnotu v porovnání s nestimulovanými buňkami. Vliv Iristatinu v souvislosti s virovou infekcí však v tomto časovém intervalu prokázán nebyl (viz Obr. 13).

V čase 96 hpi byl pozorován efekt Iristatinu na expresi proteinu jak v infikovaných buňkách, tak v neinfikovaných. Stimulace buněk s Iristatinem vedla k dvojnásobnému zvýšení exprese proteinu BiP. Ve virem infikovaných buňkách bylo vlivem Iristatinu pozorované snížení exprese tohoto proteinu (viz Obr. 13).

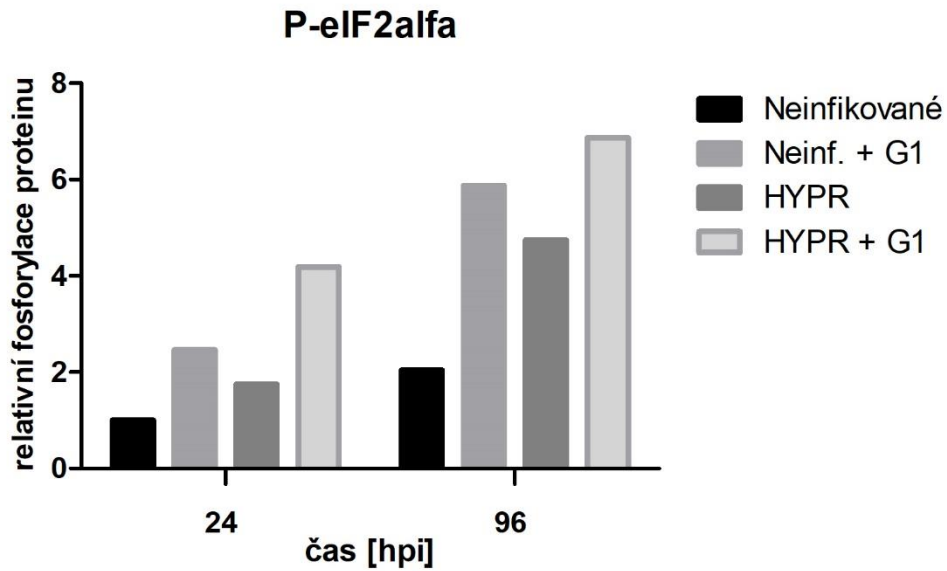
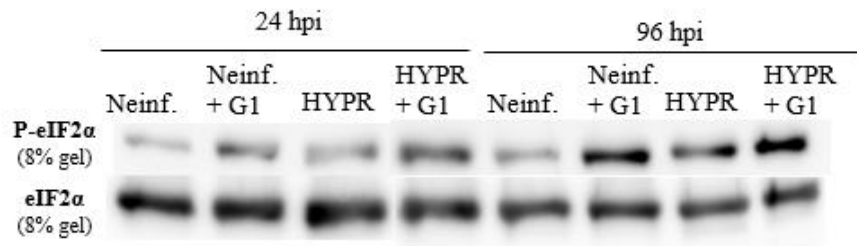


**Obr. 13:** Vliv Iristatinu (G1) na expresi proteinu BiP.

#### PERK dráha

Vliv Iristatinu byl otestován také v souvislosti s fosforylací proteinu eIF2 $\alpha$ . Výsledky této analýzy jsou získány pouze z jednoho experimentu. Důvodem pro vyřazení výsledků druhého experimentu je pravděpodobné nesestřipování totálního proteinu z membrány.

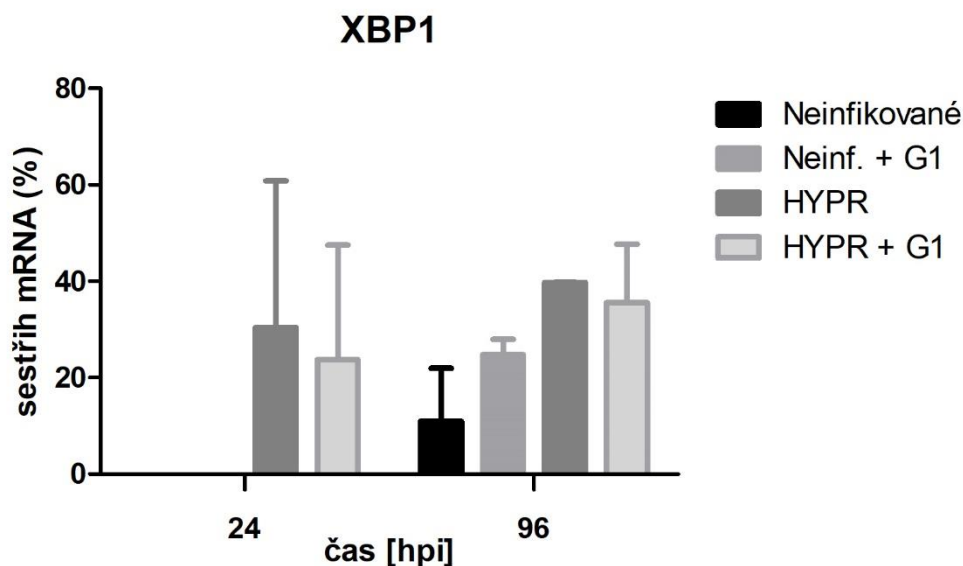
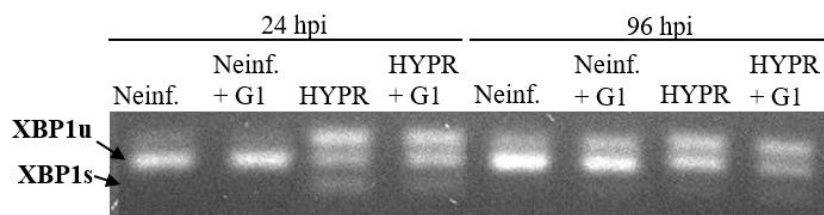
Z grafu (Obr. 14) je patrné, že vlivem Iristatinu došlo ke zvýšení fosforylace ve všech časových intervalech, a to jak u buněk neinfikovaných, tak infikovaných. Ukázalo se, že samotný Iristatin je schopný vyvolat fosforylací eIF2 $\alpha$  bez závislosti na infekci. Největší vliv Iristatinu byl zaznamenán v čas 96 hpi v neinfikovaných buňkách – fosforylace proteinu byla zvýšená 2,9-krát. V případě infikovaných buněk došlo ke 2,4 násobnému (24 hpi) a 1,45 násobnému (96 hpi) zvýšení fosforylace.



**Obr. 14:** Vliv Iristatinu (G1) na fosforylaci proteinu eIF2 $\alpha$ .

#### IRE-1 dráha

Z grafu (Obr. 15) je možné usoudit, že Iristatin neovlivňuje míru sestřihu mRNA v infikovaných buňkách v žádném testovaném časovém intervalu.

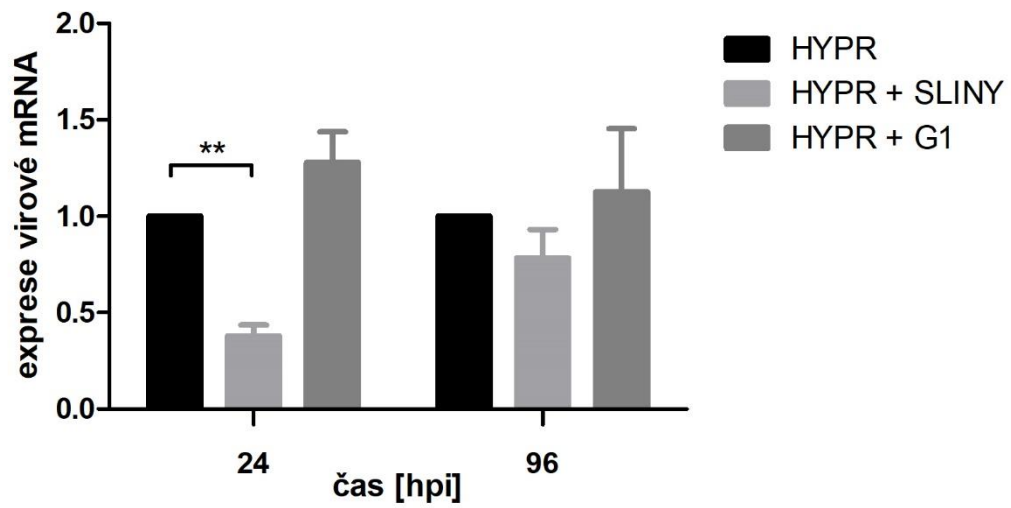


Obr. 15: Vliv Iristatinu (G1) na sestřih mRNA XBP1.

#### 4.4 Vliv slin a Iristatinu na replikaci virové mRNA v infikovaných buňkách

Pro zjištění případné změny exprese virové mRNA v jednotlivých skupinách byla provedena qPCR. Každá reakce byla provedena v duplikátech a exprese mRNA byla stanovena ve vzorcích ze dvou experimentů. Skupině Hypr v obou časových intervalech byla přiřazena hodnota 1.

Výsledky této analýzy je možné odečíst na následujícím grafu (Obr. 16). Vlivem slin byla exprese virové mRNA v čase 24 hpi významně snížena. V druhém časovém intervalu nebyl zjištěn žádný průkazný rozdíl v expresi mezi buňkami slinami stimulovanými a buňkami bez stimulace slinami. Vliv Iristatinu na expresi virové mRNA nebyl prokázán.



**Obr. 16:** Vliv slin a Iristatinu (G1) na expresi virové mRNA.

## 5 DISKUZE

Stres ER může být vyvolán řadou faktorů včetně virové infekce, během které dochází k aktivaci UPR za účelem nastolení opětovné homeostázy v ER. UPR zmírňuje ER stres navýšením kapacity ER a indukcí translace hostitelských proteinů, které se účastní skládání proteinů. Tímto mechanismem je ale zároveň také vytvářeno optimální prostředí pro virovou replikaci. Tato práce se zabývala jednotlivými drahami této stresové odpovědi (ATF-6, PERK a IRE-1 dráha) a jejich ovlivněním klišťecími slinami a Iristatinem, který je ve slinách obsažen. Iristatin byl nedávno identifikován ve slinách klišťete *I. ricinus* jako inhibitor proteáz řadící se do skupiny cystatinů. U tohoto proteinu byly prokázány protizánětlivé účinky, ale jeho vliv na UPR ve virem infikovaných buňkách dosud nebyl sledován (Kotál et al., 2019).

Experimentální práce byla rozdělena do třech dílčích částí: měření aktivace UPR v buňkách infikovaných TBEV, vliv slin na aktivaci UPR a vliv Iristatinu na aktivaci UPR v infikovaných buňkách. Dále bylo také stanoveno množství virové RNA u Hypr infikovaných buněk, buněk infikovaných se slinami, nebo infikovaných s Iristatinem. K experimentům v této práci byly použity PMJ2-R buňky, které byly infikované virulentním kmenem Hypr. Tato linie myších makrofágů byla zvolena zejména pro vysoké procento buněk dokazatelně infikovaných při infekci kmenem Hypr, které bylo ověřené přechozími experimenty v naší laboratoři (nepublikované data).

*Hypr v infikovaných buňkách mírně aktivuje UPR v obou sledovaných časových intervalech*

Prvním dílčím úkolem bylo zjistit, že UPR je aktivována v buňkách infikovaných kmenem Hypr. Za tímto účelem byly buňky infikovány virem Hypr (MOI=2) a následně byly získávány vzorky v časových intervalech 24 hpi a 96 hpi. Výsledky našich experimentů naznačují, že infekce PMJ2-R buněk kmenem Hypr mírně indukuje aktivaci všech tří větví UPR, a to ve všech sledovaných časových intervalech.

Aktivace ATF-6 dráhy nebyla měřena přímo testováním aktivované formy ATF-6 ale nepřímo stanovením (ATF-6 závislé) indukce genové exprese BiPu, a to na úrovni mRNA i proteinu. Při sledování exprese genu pro BiP bylo zjištěno, že exprese je v obou intervalech oproti kontrolním neinfikovaným buňkám signifikantně zvýšená, z čeho se dá usuzovat, že virová infekce způsobuje stres na ER, který vede k aktivaci UPR. Indukce genové exprese - BiP je spojována zejména v souvislosti s aktivací ATF-6 dráhy (Zamarbide et al., 2013; Iranpour et al., 2016; Turpin et al., 2020). Avšak k zvýšení exprese BiPu může dojít i přes aktivaci IRE-1 dráhy. Proto nelze na základě prezentovaných výsledků s určitostí říci, že v Hypr



infikovaných buňkách došlo k aktivaci ATF-6 větve UPR. Pro potvrzení či naopak vyvrácení skutečnosti, zda Hypr opravdu ATF-6 dráhu aktivuje, je nezbytné provést detekci ATF-6. Při aktivaci této dráhy dochází k odštěpení N-terminálního konce tohoto transkripčního faktoru, vzniká aktivní fragment, který je přemístěn do jádra, kde se podílí na regulaci transkripce UPR genů (Haze et al., 1999). Při stanovení aktivace ATF-6 větve UPR je proto nutné detekovat již tuto aktivní formu ATF-6 faktoru, a to například metodou Western blot či detekcí ATF-6 v jádře infikovaných buněk. V laboratoři byla v minulosti měřena ATF-6 dráha na PMJ2-R buňkách infikovaných méně virulentním kmenem Neudorfl, kdy došlo ke zvýšení množství ATF-6 v infikovaných buňkách, avšak aktivovaná forma tohoto transkripčního faktoru nebyla detekována (nepublikované data). Podobně, ATF-6 nebyl aktivován virem LGTV v HEK293T buňkách, i když zvýšená exprese proteinu BiP byla pozorována (Lewy, 2020). Na druhou stranu, experimenty Yu a kol. přítomnost aktivního faktoru ATF-6 prokázaly v buňkách Vero E6 infikovaných kmenem K23 (kmen TBEV) (Yu et al., 2013). Zdá se, že typ UPR odpovědi na ER stres závisí na buněčném typu a viru.

Aktivace PERK dráhy byla sledována prostřednictvím relativní fosforylace proteinu eIF2 $\alpha$ , která se ukázala v obou časových intervalech jako zvýšená, proto je možné uvažovat, že PERK dráha byla ve virem infikovaných buňkách aktivována. Obdobně byla fosforylace eIF2 $\alpha$  detekována v buňkách infikovaných virem DENV, a to v čase 6-72 hpi (Umareddy et al., 2007). Zvýšenou fosforylací eIF2 $\alpha$  zaznamenal (u DENV) také Peña & Harris, avšak pouze v čase 6 hpi (delší časové intervaly než 12 hpi zde nebyly sledovány) (Peña & Harris, 2011). Dále byla fosforylace eIF2 $\alpha$  zaznamenána u JEV (Wang et al., 2019) a i u TBEV (Albornoz et al., 2014).

K fosforylaci eIF2 $\alpha$  však může dojít i činností jiných kináz – například protein kinázou R (PKR), která je senzorem dsRNA v infikovaných buňkách a je schopna fosforylace eIF2 $\alpha$ . PKR se nachází zejména v cytosolu a v jádře buňky, kde v odpovědi na virovou infekci fosforyluje eIF2 $\alpha$  a inhibuje tak translaci virové mRNA. Naproti tomu PERK kináza se nachází v lumenu ER, kde je aktivována akumulací špatně sbalených proteinů (shrnuto v Donnelly et al., 2013). Protože u flavivirů nebyla aktivace PKR pozorována vůbec nebo jen v pozdějších časových intervalech (Elbahesh et al., 2011; Tu et al., 2012), je velice pravděpodobné, že k fosforylaci eIF2 $\alpha$  došlo právě díky aktivaci PERK větve. Rozpoznáním virové dsRNA dochází v infikovaných buňkách také k produkci INF. V minulosti bylo v laboratoři experimentálně prokázáno, že v infikovaných makrofázích k produkci INF nedochází (nepublikovaná data). Tato skutečnost přispívá k tvrzení, že v infikovaných buňkách nebyla PKR kináza aktivována.

Stanovení aktivace IRE-1 dráhy bylo provedeno prostřednictvím detekce sestřihu mRNA XBP1 na jeho aktivní formu XBP1s obdobně jako v jiných publikacích (Umareddy et al., 2007; Shang, 2005). Bylo zjištěno, že ve virem infikovaných buňkách dochází k indukci sestřihu a vzniku XBP1s, která byla detekovaná v obou časových intervalech. Tyto výsledky se shodují s Yu a kol., kteří detekovali XBP1s v TBEV infikovaných buňkách v časech 24 a 48 hpi (Yu et al., 2013). Obdobně byla aktivace IRE-1 dráhy pozorována i u DENV a JEV (Yu et al., 2006).

Sestřih XBP1 souvisí s aktivací ATF-6 dráhy. Aktivovaný transkripční faktor ATF-6 indukuje v jádře genovou expresi XBP1, který následně podstupuje sestřih na aktivní formu pomocí aktivované IRE-1 kinázy/endoribonukleázy (Bommiasamy et al., 2009). U některých flavivirů, včetně ZKV a LGTV, byla aktivace IRE-1 dráhy rovněž detekovaná, avšak aktivace ATF-6 dráhy pozorovaná nebyla (Lewy et al., 2020; Turpin et al., 2020). V této práci byla aktivace ATF-6 dráhy sledována prostřednictvím detekce BiPu, která by měla být potvrzena ještě další analýzou.

*V časovém intervalu 96 hpi byl vlivem slin pozorován pokles genové exprese BiP v infikovaných buňkách*

V časovém intervalu 24 hpi sliny významně neovlivňovaly žádnou z UPR drah v infikovaných buňkách. Při sledování vlivu slin na expresi genu BiP v čase 96 hpi bylo zjištěno, že sliny mají různý vliv na expresi BiPu v infikovaných a neinfikovaných buňkách. V infikovaných buňkách sliny opakovaně, i když nesignifikantně expresi BiPu snižovaly. Pokud exprese proteinu BiP reflektuje míru ER stresu, tak se dá usuzovat, že sliny zmírňují buněčný stres asociovaný s virovou infekcí. Jakým mechanismem jsou tyto změny zapříčiněny, však nebylo zjišťováno. Bohužel není možné tyto data porovnat s publikacemi, které by se vlivem slin na UPR zaobíraly, protože žádné nebyly doposud publikovány.

*Sliny ani Iristatin neovlivnily aktivaci IRE-1 v infikovaných buňkách*

Provedené experimenty neukázaly, že by sliny nebo Iristatin měly nějaký vliv na sestřih mRNA XBP1, a to v žádném ze sledovaných časových intervalů. Z toho vyplývá, že sliny ani Iristatin během virové infekce pravděpodobně neinterferují s aktivací IRE-1 dráhy.

*Přítomnost slin mírně zvyšovala fosforylaci eIF2 $\alpha$  v infikovaných i neinfikovaných buňkách v čase 24 hpi*

Zvýšená fosforylace eIF2 $\alpha$  v souvislosti se slinami byla zjištěna v intervalu 24 hpi, a to jak v buňkách infikovaných, tak neinfikovaných. Zdá se, že sliny v čase 24 hpi indukují PERK

dráhu UPR bez ohledu na to, zda jsou buňky virem infikovány. Avšak zjištěné změny ve fosforylaci proteinu nebyly signifikantní. Jak již bylo popsáno výše, fosforylace eIF2 $\alpha$  inhibuje translaci většiny mRNA včetně té virové. (Kaufman, 2002) Inhibice proteinové syntézy vlivem TBEV infekce byla nedávno popsána v meduloblastomové buněčné linii (Selinger, 2019), Zajímavá korelace PERK dráhy s replikací viru byla popsána i u WNV (Ambrose & Mackenzie, 2010) a u viru Dengue (Peña & Harris, 2011): experimenty ukázaly, že v PERK-deficientních buňkách dochází ke zvýšení virové replikace. Jak je prezentováno v této práci, v čase 24 hpi sliny signifikantně snížily expresi virové mRNA. To znamená, že sliny negativně ovlivnily replikaci viru. Proto se dá spekulovat, zda k snížení replikace viru vlivem slin nedošlo zvýšením aktivace PERK dráhy. Na základě těchto výsledků by se mohlo předpokládat, že sliny v buňkách aktivují nezávisle na infekci PERK dráhu UPR a omezují tak replikaci viru. K potvrzení tohoto předpokladu je však nutné provést další experimenty. Také by mohl být analyzován vliv slin na ATF4, transkripční faktor aktivující protein GADD34, který se zprostředkovává defosforylaci eIF2 $\alpha$ , díky které dochází k opětovné syntéze proteinů (Novoa et al., 2001; Harding et al., 2009; Marciniak, 2004).

Oproti těmto výsledkům jiné práce uvádějí, že sliny replikaci viru zvyšují. Například při infekci dendritických buněk izolovaných ze sleziny bylo vlivem slin pozorované zvýšené procento infikovaných buněk, a to u kmene Hypr i Neudorfl (Fialová et al., 2010). Pozitivní vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV byl pozorován in v myeloidních dendritických buňkách derivovaných z kostní dřeně (Lieskovská 2018). Odůvodněním by mohla být odlišná role makrofágů a dendritických buněk při infekci TBEV.

*Samotné sliny v neinfikovaných buňkách zvyšovaly v pozdějším časovém intervalu 96 hpi expresi BiPu*

Sliny v neinfikovaných buňkách v čase 96 hpi signifikantně zvýšily expresi BiPu, a to jak na úrovni RNA, tak na úrovni proteinu. Tato změna v expresi BiPu pravděpodobně nemusí přímo souviset s UPR a mohla by být vysvětlena jeho proti-apoptotickými účinky, které byly popsány zejména v souvislosti s nádorovými buňkami (Pyrko et al., 2007).

*V přítomnosti Iristatinu bylo v pozdějším intervalu detekováno v neinfikovaných buňkách zvýšené množství proteinu BiP*

Experimenty ukázaly, že Iristatin neměl žádný vliv na expresi BiPu na úrovni RNA, avšak v čase 96 hpi bylo ve virem infikovaných buňkách detekováno snížené množství proteinu BiP. V neinfikovaných buňkách Iristatin zvyšoval množství detekovaného BiP proteinu, ale expresi mRNA neovlivnil. Rozdíl v expresi RNA a proteinu může být důsledkem vlivu Iristatinu na

post-translační úpravy nebo degradaci. Účinek slin a Iristatinu na BiP je tedy podobný, ovšem v případě slin je pozorován na úrovni mRNA, kdežto v případě Iristatinu dochází ke změnám na úrovni proteinu.

## 6 ZÁVĚR

- Všechny tři větve UPR byly v Hyprem infikovaných PMJ2-R buňkách mírně aktivovány v obou sledovaných časových intervalech.
- V časovém intervalu 24 hpi sliny významně neovlivnily žádnou z UPR drah v infikovaných buňkách.
- V časovém intervalu 96 hpi byl v infikovaných buňkách vlivem slin opakovaně pozorován pokles genové exprese BiP ovšem bez statistické významnosti.
- Samotné sliny v neinfikovaných buňkách zvyšovaly v pozdějším časovém intervalu 96 hpi genovou expresi BiPu (pozorováno na úrovni mRNA a proteinu).
- Sliny ani Iristatin neovlivnily IRE-1 aktivaci v TBEV infikovaných buňkách.
- Přítomnost slin v infikovaných buňkách i v neinfikovaných buňkách mírně zvyšovala fosforylaci eIF2alfa ovšem bez statistické významnosti.
- V přítomnosti Iristatinu bylo v pozdějším intervalu detekováno v neinfikovaných buňkách zvýšené množství proteinu BiP (na úrovni mRNA nebyly pozorovány žádné změny).

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

+ssRNA	jednovláknová RNA pozitivní polarity
ADP	adenosindifosfát
APS	peroxodisíran amonný
ATF4	aktivační faktor 4
ATF-6	transkripci aktivující faktor 6
ATP	adenosintrifosfát
BiP	glukózu regulující protein (GRP78)
BOFES	bovinní fetální sérum
bZIP	bazický leucinový zip
cDNA	komplementární DNA
DENV	virus dengue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eIF2 $\alpha$	alfa podjednotka eukaryotického translačního inicializačního faktoru 2
ELFO	elektroforéza
ER	endoplazmatické retikulum
G1	Iristatin
GADD34	z angl. <i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 34</i>
Hpi	hodiny po infekci
HRP	
HRP	avidin-peroxidáza
CHOP	z angl. <i>C/EBP homologous protein</i>
IgG	imunoglobulin třídy G
IL	interleukin
INF	interferon
IRE-1	enzym 1 vyžadující inositol
IS	imunitní systém
ISG	interferonem stimulované geny
JAK/STAT	z angl. <i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
LGTV	virus Langat
mRNA	messenger RNA
ORF	otevřený čtecí rámec (z angl. <i>open reading frame</i> )
PAMPs	z angl. <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	fosfátový pufr, z angl. <i>phosphate buffered saline</i>

PERK	PKR-podobná kináza, z angl. <i>PKR-like kinase</i>
PKR	protein kináza R
prM	prekurzor membránového proteinu M
PRRs	z angl. <i>pattern recognition receptors</i>
RIDD	z angl. <i>regulated IRE-1 dependent decay</i>
RIG-I	z angl. <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	z angl. <i>rig-1 like receptors</i>
RNA	ribonukleová kyselina
SAT	slinami asistovaný přenos
SDS	dodecylsírán sodný
SGE	extrakt slinných žláz
STAT	z angl. <i>signal transducer and aktivátor of transcription</i>
TBE	klíšťová encefalitida (z angl. <i>tick-borne encephalitis</i> )
TBEV	virus klíšťové encefalidity (z angl. <i>Tick-borne encephalitis virus</i> )
TBS	z angl. <i>tris-buffered saline</i>
TEMED	tetramethylethyldiamin
TLR	z angl. <i>toll-like receptor</i>
UPR	odpověď na nesbalené proteiny, z angl. <i>unfolded protein response</i>
XBP1	X-box vázající protein 1
XBP1s	sestřižená forma mRNA XBP1, z angl. <i>spliced XBP1</i>
XBP1u	nesestřižená forma mRNA XBP1, z angl. <i>unspliced XBP1</i>
ZKV	virus Zika

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4):783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alekseev, A. N., Chunikhin, S. P., Rukhkian, M. I., & Stefutkina, L., F. (1991): The possible role of the salivary gland substrate in ixodid ticks as an adjuvant enhancing arbovirus transmission. *Parazitologiya*, 1, 28-31.
- Ambrose, R. L. & Mackenzie, J. M. (2010): West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *Journal of Virology*, 85(6), 2723–2732. doi:10.1128/jvi.02050-10
- Ambrose, R. L., & Mackenzie, J. M. (2012): ATF6 signaling is required for efficient West Nile virus replication by promoting cell survival and inhibition of innate immune responses. *Journal of Virology*, 87(4), 2206–2214. doi:10.1128/jvi.02097-12
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008): Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. doi:10.1016/j.idc.2007.12.006
- Bernales, S., Papa, F. R., & Walter, P. (2006): Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 22(1), 487–508. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120200
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2(6):326-32. doi: 10.1038/35014014
- Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.-C. & MartÃn-Acebes, M. A. (2014): Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00266
- Bommiasamy, H., Back, S. H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R. J. & Brewer, J. W. (2009): ATF6 induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 122(10), 1626–1636. doi:10.1242/jcs.045625
- Bowman, A. S., & Sauer, J. R. (2005): Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*, 129(7), 67. doi:10.1017/s0031182004006468



- Brake, D. K., & de León, A. A. P. (2012): Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, 5, 38. doi: 10.1186/1756-3305-5-38
- Brake, D. K., Wikel, S. K., Tidwell, J. P., de León, A. A. P. (2010). *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages; *Parasites & Vectors*, 3, 103. doi: 10.1186/1756-3305-3-103
- Cao, B., Parnell, L. A., Diamond, M. S. & Mysorekar, I. U. (2017): Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 214(8):2303-2313. doi: 10.1084/jem.20170957
- Carletti, T., Zakaria, M. K., Faoro, V., Reale, L., Kazungu, Y., Licastro, D., & Marcello, A. (2019): Viral priming of cell intrinsic innate antiviral signaling by the unfolded protein response. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-11663-2
- Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J.-P., Chiappino, I., Gillet, L., de Fays, K., Decrem, Y., Lebouille, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P-P., Gern, L., Sharp, P. M., & Vanderplasschen, A. (2007): Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Molecular Biology*, 16(2), 155–166. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00710.x
- Datan, E., Roy, S. G., Germain, G., Zali, N., McLean, J. E., Golshan, G., Harbajan, S., Lockshin, R. A. & Zakeri, Z. (2016): Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. *Cell Death & Disease*, 7(3), e2127–e2127. doi:10.1038/cddis.2015.409
- Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013): The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3493–3511. doi:10.1007/s00018-012-1252-6
- Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M., & Hufert, F. T. (2010): Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 213-222. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.010.
- Duan, Y., Zeng, M., Jiang, B., Zhang, W., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, L, Yu, Y., Pan, L., Chen, S., & Cheng, A. (2019): Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication. *Viruses*, 11(10), 929. doi:10.3390/v11100929

- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., & Heinz, F. X. (1999): Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80(1), 179–185. doi:10.1099/0022-1317-80-1-179
- Elbahesh, H., Scherbik, S. V., Brinton, M. A. (2011): West Nile virus infection does not induce PKR activation in rodent cells. *Virology*, 421:51–60. doi: 10.1016/j.virol.2011.08.008
- Fialová, A., Cimburek, Z., Iezzi, G., Kopecký, J. (2010): Ixodes ricinus tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and Infection*, 12, 580-585. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.015
- Francischetti, I. M., Sá-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., & Ribeiro, J. M. (2009): The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2051.
- Gething M. J. (1999): Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in Cell and Developmental Biology*,10(5):465-72
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J.-J., Gonzalez, J.-P., Gallian, P., Gritsun, T. S., Holmes, E. C., Gould, E. A., & de Lamballerie, X. (2007): Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 361(1), 80–92. doi:10.1016/j.virol.2006.09.015
- Gritsun, T. S., Frolova, T. V., Zhankov, A. I., Armesto, M., Turner, S. L., Frolova, M. P., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A. (2003b): Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis. *Journal of Virology*, 77(1), 25–36. doi:10.1128/jvi.77.1.25-36.2003
- Gritsun, T., Lashkevich, V., & Gould, E. (2003a): Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57(1-2), 129–146. doi:10.1016/s0166-3542(02)00206-1
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013): Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00026
- Harding, H. P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kafman, R. J. & Ron, D. (2009): Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106, 1832–1837. doi: 10.1073/pnas.0809632106
- Heinz, F. X. (2003). Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 21, S3–S10. doi:10.1016/s0264-410x(02)00820-4

- Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2003): Flavivirus Structure and Membrane Fusion. *Advances in Virus Research*, 63–97. doi:10.1016/s0065-3527(03)59003-0
- Hinte, F., van Anken, E., Tirosh, B. & Brune, W. (2020): Repression of viral gene expression and replication by the unfolded protein response effector XBP1u. *eLife Science*, 9. 10.7554/eLife.51804
- Hollien, J., Hin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. & Weissman, J. S. (2009): Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 186, 323–331. doi: 10.1083/jcb.200903014
- Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Simetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., Natek, V., Kraigher, A., Strle, F., & Avšič-Županc, T. (2012): Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia. *Emerging Infectious Diseases*, 19(5):806-8. doi: 10.3201/eid1905.121442
- Chen, G., Severo, M. S., Sohail, M., Sakhon, O. S., Wikel, S. K., Kotsyfakis, M., & Pedra, J. H. (2012): Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during Anaplasma phagocytophilum stimulation of immune cells. *Parasites & Vectors*, 5(1), 229. doi:10.1186/1756-3305-5-229
- Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Francischetti, I. M. B., & Kotsyfakis, M. (2012): Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3842–3854. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.026
- Iranpour, M., Moghadam, A. R., Yazdi, M., Ande, S. R., Alizadeh, J., Wiechec, E., Lindsay, R., Drebot, M., Coombs, K. M. & Ghavami, S. (2016): Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18:1. doi:10.1017/erm.2015.19
- Ivashkiv, L. B., Donlin, L. T. (2014): Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14:36-49. doi: 10.1038/nri3581.
- Jones, L. D., Hodgson, E., & Nuttall, P. A. (1989): Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *Journal of General Virology*, 70, 1895-1898.
- K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10 (11). doi: 10.1091/mbc.10.11.3787

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21):5720-8. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
- Kaufman, R. J. (2002): Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(10):1389:1398. doi: 10.1172/JCI16886
- Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2013): Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00043
- Kolpikova, E. P., Tronco, A. R., den Hartigh, A. B., Jackson, K. J., Iwawaki, T. & Fink, S. L. (2020): IRE1 $\alpha$  promotes Zika virus infection via XBP1. *Viruses*, 12, 278. doi:10.3390/v12030278
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2015): Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58–68. doi:10.1016/j.jprot.2015.07.005
- Kotál, J., Stergiou, N., Buša, M., Chlastáková, A., Beránková, Z., Řezáčová, P., Langhansová, H., Schwarz, A., Calvo, E., Kopecký, J., Mareš, M., Schmitt, E., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2019): The structure and function of Iristatin, a novel immunosuppressive tick salivary cystatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(10):2003-2013 doi:10.1007/s00018-019-03034-3
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. (2006): Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, 281(36):26298–26307. doi: 10.1074/jbc.M513010200
- Kročová, Z., Macela, A., Hernychová, L., Kroča, M., Pechová, J., & Kopecký, J. (2003): Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *Journal of Parasitology*, 89(1):14-20. doi: 10.1645/0022-3395(2003)089[0014:TSGEAP]2.0.CO;2
- Kurhade, C., Zegenhagen, L., Weber, E., Nair, S., Michaelsen-Preusse, K., Spanier, J., Gekara, N. O., Kröger, A., & Överby, A. K. (2016): Type I Interferon response in olfactory bulb, the site of tick-borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). doi:10.1186/s12974-016-0487-9

- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Štěpánová, G., & Macela, A. (2001): Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages; *Infection and Immunity*, 69, 575-578. doi:10.1128/IAI.69.1.575-578.2001
- Kýčková, K., & Kopecký, J. (2006): Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *Journal of Medical Entomology*, 43, 1208-1214. doi:10.1093/jmedent/43.6.1208
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., & Nuttall, P. A. (1993): Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology*, 7(2), 193-6. doi: 0.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x
- Lawrie, C. H., Randolph, S. E., & Nuttall, P. A. (1999): Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*, 93, 207-214. doi: 10.1006/expr.1999.4456
- 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. & Liu, H.-S. (2008): Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology*, 374(2), 240–248. doi:10.1016/j.virol.2008.02.016
- Lewy, T. G., Grabowski, J. M., & Bloom, M. E. (2017): BiP: Master regulator of the unfolded protein response and crucial factor in Flavivirus biology. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2): 291-300.
- Lewy, T. G., Offerdahl, D. K., Grabowski, J. M., Kellman, E., Mlera, L. & Chiramel, A. (2020): PERK-mediated unfolded protein response signaling restricts replication of the tick-borne flavivirus Langkat virus. *Viruses*, 12(3): 328. doi: 10.3390/v12030328
- Macháčková, M., Oborník, M., & Kopecký, J. (2006). Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in vivo. *Folia Parasitologica*, 53, 153. doi:10.14411/fp.2006.020
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T. (2009): Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 90(8), 1781–1794. doi:10.1099/vir.0.011437-0
- Marciniak, S. J. (2004): CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, 18(24), 3066–3077. doi:10.1101/gad.1250704

- McKay, D. B. (1993): Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 44:67- 98.
- Medigeshi, G. R., Lancaster, A. M., Hirsch, A. J., Briese, T., Lipkin, W. I., DeFilippis, V., Fruh, K., Mason, P. W., Nikolich-Zugich, J. & Nelson, J. A. (2007): West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *Journal of Virology*, 81(20), 10849–10860. doi:10.1128/jvi.01151-07
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997): Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, 91(3), 295–298. doi:10.1016/s0092-8674(00)80412-2
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., & Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biology*, 7(8), 766–772. doi:10.1038/ncb0805-766
- Miller, S., & Krijnse-Locker, J. (2008): Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5):363–374. doi:10.1038/nrmicro1890
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001): Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 152(4):657-68. doi: 10.1083/jcb.152.4.657
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005): A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., & Ron, D. (2001): Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *The Journal of Cell Biology*, 153(5), 1011–1022. doi:10.1083/jcb.153.5.1011
- Nuttall, P. A. (2019a): Wonders of tick saliva. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 470-481. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.11.005
- Nuttall, P. A. (2019b): Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener Klinische Wochenschrift*. doi:10.1007/s00508-019-1500-y
- Nuttall, P. A., & Labuda, M. (2004): Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129(7), S177–S189. doi:10.1017/s0031182004005633
- Nuttall, P. A., & Labuda, M. (2008): Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. *Ticks*, 205–219. doi:10.1017/cbo9780511551802.011

- Peña, J., & Harris, E. (2011): Dengue Virus Modulates the Unfolded Protein Response in a Time-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14226–14236. doi:10.1074/jbc.m111.222703
- Pulkkinen, L., Butcher, S., & Anastasina, M. (2018): Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses*, 10(7), 350. doi:10.3390/v10070350
- Pyrko, P., Schonthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., & Lee, A. S. (2007): The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Research*, 67(20), 9809–9816. doi:10.1158/0008-5472.can-07-0625
- Raftery, N., & Stevenson, N. J. (2017): Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(14):2525–2535. doi:10.1007/s00018-017-2520-2
- Randolph, S.E. (2011): Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick-borne Diseases*. 2(4), 179– 182. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.07.004
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Foldvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Špitalská, E., & Kazimírová, M. (2014): Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Frontiers in Public Health*, 2. doi:10.3389/fpubh.2014.00251
- Růžek, D., Dobler, G., & Mantke, O. D. (2010): Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 223–232. doi:10.1016/j.tmaid.2010.06.004
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M. B., Andersen, J. F., Shi, G., Chavakis, T., Ribeiro, J. M., & Kotsyfakis, M. (2009): The Immunomodulatory Action of Sialostatin L on Dendritic Cells Reveals Its Potential to Interfere with Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 182(12): 7422-7429. doi:10.4049/jimmunol.0900075
- Selinger, M., Tykalová, H., Štěrba, J., Věchtová, P., Vavrušková, Z., Lieskovská, J., Kohl, A., Schnettler, E. & Grubhoffer, L. (2019): Tick-borne encephalitis virus inhibits rRNA synthesis and host protein production in human cells of neural origin. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), e0007745. doi:10.1371/journal.pntd.0007745

- Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., Shi, H., Yang, X., Zhang, X. & Qi, L. (2009): The IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metabolism*, 9(6), 556–564. doi:10.1016/j.cmet.2009.04.009
- Shang, J. (2005): Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. *Methods*, 35(4), 390–394. doi:10.1016/j.ymeth.2004.10.012
- Schindler, A. J., & Schekman, R. (2009): In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17775–17780. doi:10.1073/pnas.0910342106
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739–789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.07413
- Schulz, M., Mahling, M., & Pfister, K. (2014): Abundance and seasonal activity of questing Ixodes ricinus ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 56–65. doi:10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98(1), 2–3. doi:10.1099/jgv.0.000672
- So, J. (2018): Roles of endoplasmic reticulum stress in immune responses. *Molecules and Cells*, 41(8):705-716. doi: 10.14348/molcells.2018.0241
- Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2013). *Biology of ticks*. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2012): Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461–473. doi:10.1016/s0140-6736(11)60103-7
- Süss, J. (2003): Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21, S19–S35. doi:10.1016/s0264-410x(02)00812-5
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2009): Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews*, 227(1):75–86. doi:10.1111/j.1600-065x.2008.00737.x
- Tan, Z., Zhang, W., Sun, J., Fu, Z., Ke, X., Zheng, C., Zhang, Y., Li, P., Liu, Y., Hu, Q., Wang, H. & Zheng, Z. (2018): ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). doi:10.1186/s12974-018-1311-5



- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. (2011): Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses*, 3(6): 920–940. doi:10.3390/v3060920
- Tu, Y.-C., Yu, C.-Y., Liang, J.-J., Lin, E., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L. (2012): Blocking Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase PKR by Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein 2A. *Journal of Virology*, 86(19), 10347–10358. doi:10.1128/jvi.00525-12
- Turpin, J., Frumence, E., Harrabi, W., Haddad, J. G., El Kalamouni, C., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P. & Viranaïcken, W. (2020): Zika virus subversion of chaperone GRP78/BiP expression in A549 cells during UPR activation. *Biochimie*, 175:99-105. doi:10.1016/j.biochi.2020.05.011
- Umareddy, I., Pluquet, Q., Wang, Q. Y., Vasudevan, S. G., Chevet, E. & Gu, F. (2007): Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virology Journal*, 4:91. doi: 10.1186/1743-422X-4-91
- Upadhyay, A. S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K. L., Dobler, G., Guo, J., Superti-Furga, G., Lill, E., Överby, A. K. & Weber, F. (2013): Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cellular Microbiology*, 16(6):834–848. doi:10.1111/cmi.12241
- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R. & Oakes, S. A. (2012): IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science*, 338, 818–822. doi: 10.1126/science.1226191
- Walter, P., & Ron, D. (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081–1086. doi:10.1126/science.1209038
- Wang, Q., Xin, X., Wang, T., Wan, J., Ou, Y., Yang, Z., Yu, Q., Zhu, L., Guo, Y., Wu, Y., Ding, Z., Zhang, Y., Pan, Z., Tang, Y., Li, S. & Kong, L. (2019). Japanese encephalitis virus induces apoptosis and encephalitis by activating the PERK pathway. *Journal of Virology*, 93(17). doi:10.1128/jvi.00887-19
- Wang, Y., Xing, P., Cui, W., Wang, W., Cui, Y., Ying, G., Wang, X. & Li, B. (2015): Acute Endoplasmic Reticulum Stress-Independent Unconventional Splicing of XBP1 mRNA in the Nucleus of Mammalian Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 13302–13321. doi:10.3390/ijms160613302

- Wei, J., Gaut, J. R. & Hendershot, L. M. (1995): In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(44):26677-82.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. (2001): XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881–891. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0
- Yu, C., Achazi, K., & Niedrig, M. (2013): Tick-borne encephalitis virus triggers inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and transcription factor 6 (ATF6) pathways of unfolded protein response. *Virus Research*, 178(2), 471–477. doi:10.1016/j.virusres.2013.10.012
- Yu, C.-Y., Hsu, Y.-W., Liao, C.-L., & Lin, Y.-L. (2006): Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *Journal of Virology*, 80(23), 11868–11880. doi:10.1128/jvi.00879-06
- Zamarbide, M., Martinez-Pinilla, E., Ricobaraza, A., Aragón, T., Franco, R., & Pérez-Mediavilla, A. (2013): Phenyl Acyl Acids Attenuate the Unfolded Protein Response in Tunicamycin-Treated Neuroblastoma Cells. *PLOS ONE*, 8(8). doi:10.1371/journal.pone.0071082
- Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern, L., & Piesman, J. (2002): Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *The Journal of Parasitology*, 88, 1276-1278. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[1276:COBSWT]2.0.CO;2