Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie

Bc. Jana Kožantová

Měření aktivace signálních drah v myší makrofágové linii IC-21 a primárních dendritických buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy

Measurement of signaling pathway activation in mouse macrophage line IC-21 and primary dendritic cells after infection with tick-borne encephalitis virus

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Jana Páleníková

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 08. 2016

Jana Kožantová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala své vedoucí práce paní Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D. za její cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Páleníkové za pomoc při práci v laboratoři, zaškolení a rady, které mi udělila. Poděkování patří také kolektivu laboratoří Katedry medicínské biologie na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích, kde mi dovolili provádět výzkum k mé diplomové práci. A nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Klíšťová encefalitida je závažným onemocněním centrální nervové soustavy. Je způsobena virem klíšťové encefalitidy, který je přenášen klíšťaty. Česká republika patří mezi země s největším výskytem této nemoci. Virus klíšťové encefalitidy je schopen se replikovat v několika buněčných typech. V práci jsme se zaměřili na makrofágovou linii IC-21 a dendritické buňky, protože jsou to jedny z prvních buněk přicházejících do kontaktu s virem a zároveň napomáhají šíření viru v hostiteli v počáteční fázi infekce. Dosud není znám specifický receptor pro vstup viru do buňky, ani které signální dráhy aktivuje. Proto jsme se rozhodli prozkoumat aktivaci vybraných signálních drah po infekci virem klíšťové encefalitidy a ovlivnění této aktivace klíštěcími slinami. K tomuto účelu byly využity metody duální luciferázové eseje, imunosendvičové eseje a western blotu. Ze získaných výsledků vyplývá, že ve virem infikovaných buňkách IC-21 se aktivuje fosfatidyl-inositolová dráha, NF-κB, signální molekula Erk1/2 a další. Testování vlivu klíštěcích slin ukázalo, že jejich účinkem dochází k signifikantnímu snížení aktivity signálních molekul NF-κB, AP-1 a CREB.

Klíčová slova

- Klíšťová encefalitida
- Virus klíšťové encefalitidy
- Signální dráhy
- Makrofágová linie IC-21
- Dendritické buňky
- Duální luciferázová reportérová esej
- PathScan® Intracellular Signaling Array
- Western blot
- Klíštěcí sliny

Abstract

Tick-borne encephalitis is a serious disease of the central nervous system. It is caused by tick-borne encephalitis virus, which is transmitted by ticks. The Czech Republic is one of the countries with the highest prevalence of this disease. Tick-borne encephalitis virus is able to replicate in several cell types. In this work we focused on macrophage line IC-21 and dendritic cells, because these cells are the first, which encounter the virus and support its spreading in the host at early stage of infection. So far there is not known any specific receptor for virus entry into cells or which signaling pathways activates. Therefore, we decided to investigate the activation of selected signaling pathways after infection with tick-borne encephalitis virus and influence of tick saliva on this activation. We employed methods of dual luciferase reporter assay, immunosandwich assay and western blot. The obtained results showed that in virus infected IC-21 cells are activated phosphatidyl-inositol pathway, NF-κB pathway, signaling molecule Erk1/2 and others. Testing of tick saliva effect revealed significantly decreased activity of NF-κB, AP-1 and CREB.

Key words

- Tick-borne encephalitis
- Tick-borne encephalitis virus
- Signaling pathways
- Macrophage line IC-21
- Dendritic cells
- Dual luciferase reporter assay
- PathScan® Intracellular Signaling Array
- Western blot
- Tick saliva

Obsah

Úvod 11
Cíle práce 12
1 Přehled literatury 13
1.1 Klíšťová encefalitida 13
1.1.1 Definice klíšťové encefalitidy 13
1.1.2 Přenos 13
1.1.3 Patogeneze klíšťové encefalitidy 14
1.2 Virus klíšťové encefalitidy 16
1.2.1 Stavba virové částice 17
1.2.2 Infekce hostitelské buňky 19
1.2.3 Efekt virové infekce na hostitelskou buňku 20
1.3 Buňky přirozené imunity 22
1.3.1 Makrofágy 22
1.3.2 Dendritické buňky 23
1.4 Přirozená imunita a flavivirová infekce 24
1.4.1 Rozpoznání virových struktur hostitelskou buňkou 24
1.4.2 Signální dráhy aktivované v buňkách přirozené imunity 26
2 Materiál a metody 32
2.1 Materiál 32
2.1.1 IC-21 32
2.1.2 Myeloidní dendritické buňky 32
2.1.3 Vir klíšťové encefalitidy 32
2.1.4 Klíštěcí sliny 33
2.1.5 Aktivátory 33
2.1.6 Plazmidy 33
2.2 Metody 35
2.2.1 Měření aktivace signálních drah pomocí duální luciferázové reportérové eseje 35

2.2.2 Měření aktivace signálních drah pomocí kitu PathScan® Intracellular Signaling Array (Chemiluminiscent Readout) 39
2.2.3 Měření aktivace signálních drah pomocí metody western blot 41
2.3 Statistická analýza 43
3 Výsledky 44
3.1 Optimalizace metody využívající duální luciferázovou reportérovou esej na měření aktivity signálních drah v buňkách IC-21 44
3.2 Testování funkčnosti dalších plazmidů 47
3.3 Měření aktivace vybraných signálních drah po infekci virem KE 49
3.4 Vliv klíštěcích slin na aktivaci NF-κB, AP-1 a CREB vyvolanou virem KE .. 51
3.5 Měření aktivace signálních drah pomocí kitu PathScan® Intracellular Signaling Array 55
3.6 Měření aktivace signálních drah pomocí metody western blot 57
4 Diskuze 60
5 Souhrn 65
6 Seznam použité literatury 66

Seznam zkratek

Ag – Antigen

Akt – Proteinkináza B

ANOVA – Analýza variance

AP-1 – Activator protein-1

APC – Antigen prezentující buňka

ATB – Antibiotika

ATF2 – Activating transcription factor 2

BOFES – Bovinní fetální sérum

BR – BAFF-receptor

cAMP – Cyklický adenosinmonofosfát

C3R – C3 receptor

CCR5 – C-C motif chemokine receptor 5

CD – Cluster of differentiation

CNS – Centrální nervová soustava

CRE – cAMP response element

CREB – cAMP response element-binding protein

DC – Dendritická buňka

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DTH – Oddálený typ hypersensitivity

dsRNA – Dvouvláknová ribonukleová kyselina

ER – Endoplazmatické retikulum

Erk – Extracellular signal-regulated kinases

Ets – Erythroblast transformation-specific domain

FcR – Fc receptor

GL – L-glutamin

GM-CSF – Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HSP – Heat shock protein

IFN – Interferon

IFNAR1/2 – Interferon-α/β receptor

Ig – Imunoglobulin

IκB – Inhibitor of kappa B

IKK – Inhibitor of kappa B kinase

IL – Interleukin

IP-10 – Interferon-γ indukovaný protein

IRE – Inositol-requiring enzyme 1

IRF – Interferon regulatory factor

IS – Imunitní systém

ISGF3 – Interferon-stimulated gene factor 3

ISRE – Interferon-stimulated response element

IQ – Imiquimod

JAK – Janus kinase

JNK – c-Jun N-gterminal kinases

KE – Klíšťová encefalitida

KM – Kondiciované médium

LB – Lysogeny broth medium

LAR II – Luciferase assay reagent II

LPS – Lipopolysacharid

LTβR – Lymfotoxin-β receptor

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

MAPKK – Mitogen-activated protein kinase kinase

MAPKKK – Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

MDA5 – Melanoma differentiation-associated gene 5

ME – 2-merkaptoetanol

MHC – Major histocompatibility complex

MNK – MAPK-interacting kinases

MOI – Multiplicity of infection

mRNA – Messenger RNA

MSK – Mitogen and Stress activated protein kinase

MyD88 – Myeloid differentiation primary response gene 88

NEAA – Non-essential amino acid

NEMO – NFκB essential modulator

NFAT – Nuclear factor of activated T-cells

NFκB – Nuclear factor kappa B

NIK – NFκB-inducing kinase

NK buňky – Natural killer

NLRs – Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

PAMPs – Pathogen associated molecular patterns

PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS – Phosphate Buffered Saline

PERK – protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PFU – Plaque-forming unit (plakotvorná jednotka)

PI3K – Fosfatidylinositol-3 kináza

PKA – Proteinkináza A

PMA – Phorbol-myristoyl acetát

PS – porcine stable kidney cell line

PRRs – Pattern recognition receptors

RIPA pufr – Radio Immuno Precipitation Assay buffer

RIG-I – Retinoic acid inducible gene I

RLRs – Retinoic acid inducible gene I-like receptors

RLU – Relativní luminiscenční jednotka

RNA – Ribonukleová kyselina

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

RSK – Ribosomal S6 kinase

SAPK – Stress-activated protein kinases

SH2 – Src homology 2

ssRNA – Single stranded RNA – jednovlákná RNA

STAT – Signal transducers and activators of transcription

SV40 – Simian virus 40

TBS – Tris Buffered Saline

TBST – Roztok Tris Buffered Saline (TBS) s Tweenem (0,1%)

Th – Pomocné T lymfocyty

TIR – Toll-interleukin receptor

TIRAP – TIR-domain-containing adepter protein

TLR – Toll like receptor

TNF-α – Tumor necrosis factor-alfa

TRAM – TRIF-related adaptor molecule

TRIF – TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

Tyk2 – Tyrosine kinase2

UPR – Unfolded protein response

Úvod

Klíšťová encefalitida je závažným infekčním onemocněním postihujícím centrální nervový systém. Je způsobena virem klíšťové encefalitidy (KE), který je přenášen klíšťaty. Při přisátí klíštěte dochází k poškození hostitelské tkáně a následně k obranné reakci hostitele. Klíštěcí sliny obsahují celou řadu látek, které napomáhají potlačovat hostitelskou imunitní odpověď. Spolu se slinami se dostává do hostitelského organismu i virus klíšťové encefalitidy.

Jako první se s virem setkávají dendritické buňky a následují další buňky přirozené imunity – monocyty, makrofágy a NK buňky. Infikované buňky produkují celou škálu prozánětlivých cytokinů a chemokinů, může dojít k aktivaci komplementu, spuštění apoptózy či autofágie. Zatím není znám specifický receptor pro virus klíšťové encefalitidy, ani které signální dráhy jsou touto infekcí spuštěny.

V práci jsme se zabývali měřením aktivace různých signálních drah v myší makrofágové linii IC-21 a v primárních dendritických buňkách po infekci virem KE pomocí duální luciferázové reportérové eseje, imunosendvičové eseje a western blotu. Dále jsme se snažili prozkoumat vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah po infekci virem KE.

Výzkum byl prováděn v laboratořích Katedry medicínské biologie na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích. V laboratoři se dlouhodobě zabývají vlivem klíštěcích slin na hostitelskou imunitu a na přenos patogenů, včetně viru klíšťové encefalitidy.

Cíle práce

- Výběr optimální metody na měření aktivace signálních drah v makrofázích a dendritických buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy.
    a. Použití duální luciferázové reportérové eseje, včetně optimalizace této metody.
    b. Použití PathScan Intracellular Signaling Array včetně ověření metodou western blotu.
- Vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah po infekci virem klíšťové encefalitidy.

1 Přehled literatury

1.1 Klíšťová encefalitida

1.1.1 Definice klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida (KE) je jedním z typů encefalitidy. Původcem onemocnění je virus KE přenášený klíšťaty, který je nejvýznamnějším zástupcem seroskupiny KE spadající do skupiny *Flavivirus* a čeledi Flaviviridae. Jsou popsány 3 subtypy – evropský, dálnovýchodní a sibiřský (Růžek a kol., 2015).

Je to závažné infekční onemocnění, které postihuje centrální nervový systém. Tato nemoc je rozšířená v endemických oblastech Evropy a severovýchodní Asie (Ahantarig et al., 2009).

Onemocnění vyžaduje přítomnost rezervoáru viru – hostitele, klíšťata, která mají funkci vektorů, a samotný patogen (ECDC, 2012).

1.1.2 Přenos

Virus klíšťové encefalitidy se přenáší nejčastěji klíšťaty, méně často pak konzumací nepasterizovaného mléka a mléčných výrobků (Růžek a kol., 2015).

Nejčastějším způsobem přenosu je přisátí infikovaného klíštěte. Jedná se o druh klíštěte *Ixodes ricinus* (Evropa) a *Ixodes persulcatus* (východní Evropa, Sibiř, Japonsko a Čína). V Evropě existují i další druhy klíšťat, které mohou virus přenášet. Jedná se např. o *I. hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemophysalis punctata* a další (Růžek a kol., 2015).

U klíštěte se rozlišují 3 aktivní vývojová stadia, z nichž každé saje krev pouze jednou. Virus klíšťové encefalitidy dokáže přecházet mezi jednotlivými vývojovými stadii, ale i mezi generacemi klíšťat prostřednictvím klíštěcích vajíček. Člověk může být napaden larvou, nymfou i dospělou samicí a zároveň všemi může být infikován.

Vývojový cyklus klíštěte trvá v závislosti na podmínkách 1,5 až 2 roky (Kříž a kol., 2015).

Prevalence výskytu viru KE v klíšťatech ve střední Evropě je okolo 0,1 – 5 %. Závisí to na lokalitě, době sběru klíšťat a také na jejich vývojovém stadiu. Více infikovaná jsou vyšší vývojová stadia klíšťat. Více promořená jsou klíšťata druhu *Ixodes persulcatus* než *Ixodes ricinus* (Bormane a kol., 2004).

1.1.3 Patogeneze klíšťové encefalitidy

Ústní ústrojí klíštěte proniká při sání hluboko do kůže a podkožního vaziva, čímž dochází k poškození hostitelské tkáně a následné obranné reakci hostitele. Aby klíště tyto obranné reakce potlačilo, sekretuje během sání do rány sliny, které obsahují látky tlumící srážení krve i látky, které potlačují hostitelskou imunitní odpověď na přisáté klíště (Chmelař a kol., 2012). Spolu se slinami se dostává do podkoží hostitele i virus, který se zde i pomnoží v různých typech buněk (Labuda a kol., 1996).

Jako první antigen prezentující buňky (APC) vystavující Ag viru klíšťové encefalitidy T lymfocytům se uplatňují dendritické buňky, konkrétně Langerhansovy buňky kůže. T lymfocyty se poté diferencují na pomocné a cytotoxické T lymfocyty. Pro patogenezi viru je velmi důležitá schopnost Langerhansových buněk přenést virus z místa vstupu do organismu do spádových mízních uzlin (Málková a Filip, 1968). Klíštěcí sliny mají schopnost ovlivnit některé vlastnosti dendritických buněk po infekci virem KE a tím také napomáhají přenosu viru (Fialová a kol., 2010).

Lymfatické uzliny jsou místem, kde se virus opět pomnoží, tentokrát v makrofázích. Toto pomnožení je zásadní pro rozvoj infekce. Pokud virus nemá schopnost infikovat a pomnožit se v makrofázích, nevyvolá viremii a nedostane se do centrální nervové soustavy (CNS) (Ahantarig a kol., 2009).

Během primární viremie, kdy je virus uvolňován z lymfatických uzlin do krve, se dostává do různých tkání a orgánů v těle. Tam se dále pomnožuje a uvolňováním do krevního řečiště vzniká tzv. sekundární viremie, při níž také vznikají první příznaky

nemoci připomínající chřipku. Právě během sekundární viremie je virus schopen překonat hematoencefalickou bariéru a proniknout do CNS (Růžek a kol., 2015).

Neurony jsou hlavním cílem pro virus klíšťové encefalitidy v CNS. U infikovaných neuronů se reorganizují a zvětšují membránové struktury – hlavně endoplazmatické retikulum (ER) a Golgiho komplex. Virové antigeny se vyskytují v perinukleární oblasti i dendritech neuronů (Hirano a kol., 2014). Také astrocyty se morfologicky mění vlivem infekce a reagují produkcí celé řady prozánětlivých cytokinů a chemokinů – např. TNF-α, IFN-α, IL-1β, IL-6, IL-8 a IP-10 (IFN-γ indukovaný protein), který může mít zároveň neurotoxický účinek (Palus a kol., 2014). Interleukiny mají podíl na regulaci imunitních dějů. IL-6 má většinou protektivní účinek, i když někdy může přispět k rozvoji infekce. Nález IL-10 v mozkomíšním moku značí těžší průběh nemoci (Günther, 1997). Vyšší produkce cytokinů a prozánětlivých mediátorů způsobuje narušení hematoencefalické bariéry (Růžek a kol., 2011).

U poškozených neuronů dochází často k nekróze. Mikroglie fagocytují degradační produkty. Mikroglie i astrocyty proliferují (Gelpi a kol., 2005).

Zánětlivou reakci v mozku hostitele lze rozdělit na 2 fáze. V 1. fázi lze pozorovat nespecifickou aktivitu granulocytů a makrofágů. Ve 2. fázi se jedná o specifickou zánětlivou reakci, které se účastní lymfocyty, monocyty a makrofágy (Gelpi a kol., 2005).

Celkový průběh klíšťové encefalitidy určuje poměr mezi protektivní rolí imunitního systému (IS) a imunopatologickými reakcemi. Imunopatologické reakce způsobují hlavně cytotoxické T lymfocyty (Růžek a kol., 2009a). Experimentálně bylo dokázáno, že myši, u nichž byla potlačena aktivita imunitního systému, přežívaly déle po infekci klíšťové encefalitidy, oproti myším s plně aktivním imunitním systémem (Semenov a kol., 1981).

Během infekce se tvoří také specifické protilátky, nejdříve ve třídě IgM a poté IgG. Protilátky se vyskytují v séru i mozkomíšním moku. Protilátky IgM se objevují během 1. fáze nemoci, tzn. s výskytem prvních nespecifických příznaků, a přetrvávají v séru několik týdnů až měsíců po vyléčení. Naopak IgG protilátky jsou přítomny dlouhodobě

a představují tak dlouhodobou až celoživotní imunitu (Günther a kol., 1996; Růžek a kol., 2013).

Na průběh infekce virem klíšťové encefalitidy má vliv řada faktorů – kmen viru, jeho virulence, věk, pohlaví a stav imunity hostitele. Podílí se na tom i genotyp hostitele. Například jedinci s funkční variantou genu pro TLR-3 (Toll like receptor-3) jsou náchylnější pro infekci virem KE (Mickiené a kol., 2014). Navázáním ligandu na TLR se spouští signální kaskáda vedoucí k tvorbě cytokinů a chemokinů stimulujících činnost lymfocytů. Ligandem pro TLR-3 je dvouvláknová RNA, která vznikla jako meziprodukt při replikaci. Dalším příkladem může být delece genu pro CCR5, jež se také častěji vyskytuje u nemocných s KE. Chemokinový receptor CCR5 má zásadní roli při transportu leukocytů přes hematoencefalickou bariéru (Kindberg a kol., 2008).

1.2 Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy se řadí do rodu *Flavivirus* a čeledi Flaviviridae. Tento rod tvoří viry přenášené komáry (např. virus žluté zimnice, virus dengue, virus japonské encefalitidy), viry přenášené klíšťaty a viry, které nemají žádný vektor. Do seroskupiny klíšťové encefalitidy se kromě viru klíšťové encefalitidy řadí dále virus Langat, virus vrtivky, virus Powassan a další (Růžek a kol., 2015).

Virus klíšťové encefalitidy je dále členěn na 3 antigenní subtypy, které odpovídají 3 genotypům. Evropský genotyp je charakterizován kmenem Neudörfl jako svým prototypem. Prototypový kmen Sofjin je u dálnovýchodního typu a kmeny Vasilchenko a Zausaev jsou prototypy sibiřského genotypu (Ecker a kol., 1999).

Evropský subtyp prezentují kmeny, které pocházejí z České republiky, Rakouska, Švýcarska, Francie, Německa a evropské části Ruska. Encefalitida způsobená těmito kmeny má většinou dvoufázový průběh. Fatální následky jsou u méně než 1 % případů (Gritsun a kol., 2003).

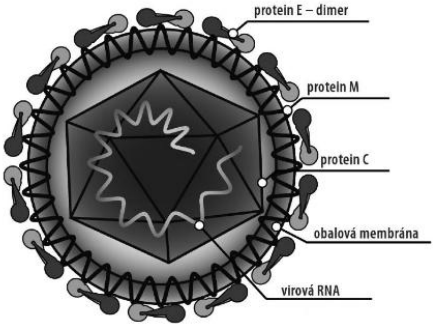
Dálnovýchodní subtyp je charakterizován kmeny z Ruska, Japonska, Číny, Litvy a Ukrajiny. Infekce způsobená těmito kmeny má velmi závažný průběh, časté jsou paralýzy končetin. Oproti evropskému subtypu častěji končí fatálně. Patří sem např. kmen Koltsovo, který je původcem závažného hemoragického syndromu, jenž způsobuje masivní krvácení do gastrointestinálního traktu, a nemocní umírají za 2 – 3 dny od prvních krvácivých příznaků (Ternovoi a kol., 2003).

Kmeny izolované v centrální Sibiři představují sibiřský subtyp. Encefalitida má většinou mírnější průběh s horečkou, bez paralýz končetin. Fatální následky jsou u 6 – 8 % případů. Infekce má tendenci přecházet do chronického stavu (Gritsun a kol., 2003).

Evropské kmeny viru klíšťové encefalitidy jsou dle antigenního srovnání blíže příbuzné viru vrtivky než sibiřským a dálnovýchodním kmenům (Grard a kol., 2007). Ale i v rámci jednotlivých subtypů se vyskytují kmeny s různou virulentností. Například do evropského subtypu řadíme kmen Hypr, který je mnohem virulentnější než prototypový Neudörfl. A jsou zde také naopak kmeny, jež jsou spíše oslabené či avirulentní. Takovým příkladem je kmen 263, který byl izolován v roce 1987 v jižních Čechách (Růžek a kol., 2008a).

1.2.1 Stavba virové částice

Virová částice má většinou kulovitý tvar o průměru 50 – 60 nm. Virion tvoří ikosahedrální nukleokapsid, který je obklopený fosfolipidovou membránou. Genom je tvořen z lineární jednořetězcové RNA o pozitivní polaritě. Kapsida je sestavena z kapsidového proteinu C. Na fosfolipidové membráně se rozlišují 2 typy povrchových proteinů – obalový glykoprotein E a membránový protein M (Mansfield a kol., 2009).



Obr. 1: Virion viru klíšťové encefalitidy (grafika Patrik Kilian, Růžek a kol., 2015)

Virová RNA tvoří 1 otevřený čtecí rámec, jenž na obou koncích obklopují nekódující sekvence. Na 5´ konci RNA je 7-methylguanosinová čepička, jejímž úkolem je chránit virovou RNA před rozkladem buněčnými enzymy, dále usnadňuje transport mRNA a spuštění translace na ribozomu. 3´ konec je charakterizován značnou sekvenční a strukturní heterogenitou u jednotlivých izolátů viru a není polyadenylován. Otevřený čtecí rámec kóduje 1 rozsáhlý polyprotein, který je poté štěpen virovými a buněčnými proteázami. Vznikají 3 strukturní (C, prM, E) a 7 nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) proteinů (Gritsun a kol., 2003; Mansfield a kol., 2009).

Protein C je první, který se z polyproteinu odštěpí. N- a C-konce proteinu C pravděpodobně interagují s virovou RNA. C-konec zároveň slouží jako signální sekvence, která napomáhá zavést prM do membrány endoplazmatického retikula. Do membrány ER je translokován i obalový protein E, který se zakotvuje do membrány hydrofobním koncem a většinou dochází k jeho glykosylaci (Gritsun a kol., 2003; Mansfield a kol., 2009).

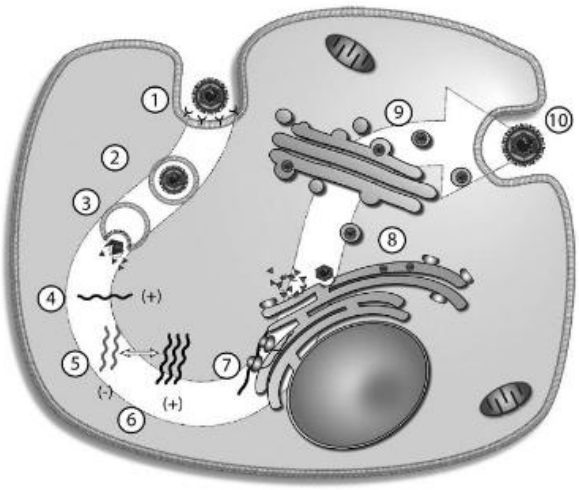
Nejdůležitější antigenní determinantou viru je protein E. Zodpovídá za specifickou vazbu k buněčnému receptoru, proniknutí viru do hostitelské buňky a nejspíš je to i ta část viru, která určuje jeho virulenci (Gritsun a kol., 1995).

1.2.2 Infekce hostitelské buňky

Počátek infekce je charakterizován vazbou virové částice na receptor na povrchu buňky. Dosud není známý specifický receptor pro virus klíšťové encefalitidy. Virus využívá pro replikaci různé typy buněk u obratlovců i u klíšťat. Proto se předpokládá, že receptorem by mohla být evolučně konzervovaná molekula – např. heparansulfát (Růžek a kol., 2015).

Po navázání na receptor proniká virus do buňky endocytózou. Okyselení vnitřku endozomu způsobuje změnu konformace obalového glykoproteinu E, přeuspořádání z dimerů na trimery. To způsobí fúzi virové obalové membrány s membránou endozomu a následné uvolnění nukleokapsidy viru do cytoplazmy. Po rozložení nukleokapsidy se uvolňuje virová RNA. Díky její pozitivní polaritě slouží přímo jako templát pro syntézu virového polyproteinu. Vzniklý polyprotein je dále štěpen pomocí virových i buněčných proteáz na jednotlivé strukturní i nestrukturní proteiny. Virový nestrukturní protein NS5 se podílí na syntéze komplementárního vlákna RNA tentokrát negativní polarity. Během replikace se tvoří více vláken s pozitivní polaritou než s negativní (Mandl, 2005).

Dozrávání částic viru klíšťové encefalitidy může probíhat 2 cestami – cis a trans. Pokud dochází k cis maturaci, viriony jsou kompletovány v cytoplazmě. Odtud putují k buněčné membráně, přes niž pučí a získávají tak svůj obal. U trans maturace se obalené viriony hromadí v měchýřcích ER a dostávají se do Golgiho komplexu. Odtud se skrze transportní váčky dostávají k povrchu buněčné membrány. Fúzí buněčné membrány s membránou váčku se dostávají ven z buňky. Pro hostitelské buňky je charakteristické hypertrofované endoplazmatické retikulum. V hostitelských buňkách obratlovců dochází spíše k trans maturaci, zatímco v klíštěcích buňkách k cis maturaci (Šenigl a kol., 2006).



Obr. 2: Schéma replikace viru klíšťové encefalitidy v hostitelské buňce (grafika Patrik Kilian, Růžek a kol., 2015)

1.2.3 Efekt virové infekce na hostitelskou buňku

V klíštěcích buňkách virus KE přetrvává a množí se v nich, ale nepoškozuje je (Růžek a kol., 2008b). Naopak v buňkách obratlovců způsobuje celou řadu morfologických a fyziologických změn (cytopatický efekt) a může vést až k jejich smrti. Příkladem změn může být proliferace a reorganizace ER a Golgiho komplexu (Růžek a kol., 2009b; Palus a kol., 2014). Tyto změny mohou vést ke vzniku vezikulárních struktur obalujících virový replikační komplex. Vzniklé replikační kompartmenty tvoří optimální mikroprostředí pro replikaci virové RNA, protože hromadí všechny důležité komponenty nutné pro syntézu nových vláken virové RNA. Také vytvářejí oporu pro ukotvení virového replikačního komplexu (Miorin a kol., 2013).

Infekce virem KE může vést až k apoptotické či nekrotické smrti buňky. Při nekróze se svrašťuje a tmavne jádro a následně se rozpadá na malé fragmenty nebo dochází ke karyolýze. Zvětšují se organely, dochází k vakuolizaci a prasknutí membrán organel i buňky samotné. Z lysozomů se uvolňují enzymy a nastává autolýza buňky.

Vylití obsahu buňky může způsobit i nekrózu okolní tkáně a rozvoj zánětu (Růžek a kol., 2015).

Apoptóza je jedním z hlavních typů programované buněčné smrti. Řada biochemických procesů vede k degradaci cytoskeletu a následné změně tvaru cytoplazmatické membrány, smrštění buňky a rozpadu jádra i chromozomů. Buňka se rozpadá do apoptotických tělísek, která jsou fagocytována makrofágy. Při apoptóze nedochází k rozvoji zánětu (Růžek a kol., 2015).

Při infekci flaviviry se uplatňuje i autofágie, která je za fyziologických okolností buněčnou odpovědí na environmentální stres. Mnoho virů ji ale také využívá jako strategii pro přežití, která podporuje jejich životní cyklus – provirová autofágie. Rovněž stres endoplazmatického retikula, vyvolaný replikací viru, vede k aktivaci několika signálních drah souhrně označovaných jako unfolded protein response (UPR). Iniciace UPR signalizace je zásadní pro přežívání buněk i replikaci viru. Flaviviry indukují UPR signalizaci po infekci v savčích buňkách. Ale ne vždy je aktivována stejná UPR dráha, dokonce záleží i na kmenu stejného viru (Iranpour a kol., 2016).

U virem infikovaných buněk dochází k produkci interferonů I. typu, které navozují antivirový stav neinfikovaných buněk a vedou k apoptóze infikovaných buněk. Interferony se podílejí i na koordinaci buněčné a humorální imunity – např. zvyšují expresi molekul MHC, čímž pomáhají vystavování virových antigenů buňkám IS. Po navázání molekuly interferonu na specifický receptor na povrchu buňky je spuštěna signální dráha JAK-STAT. Výsledkem je stimulace exprese IFN-inducibilních genů (Růžek a kol., 2015).

Virus klíšťové encefalitidy je vysoce citlivý k antivirovým účinkům interferonů, ale zároveň má schopnost inhibovat signalizační IFN-iniciovanou kaskádu JAK-STAT. Využívá svého nestrukturního proteinu NS5 jako antagonisty IFN (Best a kol., 2005). Interferony I. typu indukují expresi molekuly Viperinu, jež má silný inhibiční účinek na syntézu genomu viru klíšťové encefalitidy (Upadhyay a kol., 2014).

1.3 Buňky přirozené imunity

Velkou část imunitního systému tvoří různé druhy leukocytů. Z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni vznikají dvě buněčné linie – myeloidní a lymfoidní. Právě buňky myeloidní linie tvoří základ přirozené imunity. Spolu s makrofágy a dendritickými buňkami, na které jsem se ve své práci zaměřila, do této skupiny patří také monocyty, neutrofily, eosinofily, bazofily a žírné buňky.

1.3.1 Makrofágy

Makrofágy patří spolu s dalšími mezi buňky přirozené imunity. Jsou tkáňovou formou monocytů, které vznikají z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Odtud jsou vyplavovány do krevního oběhu, kde kolují cca 8 hodin. Poté vstupují do tkání a přeměňují se na makrofágy, které žijí relativně dlouho. Mezi tkáňové makrofágy patří např. Kupfferovy buňky v játrech, histiocyty, osteoklasty a mikroglie (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Makrofágy patří spolu s neutrofily, eosinofily a monocyty mezi tzv. profesionální fagocyty. Jsou důležité v první linii přirozené imunitní reakce, kdy pohlcují a zabíjejí invadující mikroorganismy, přičemž využívají uvolnění antibakteriálních a proteolytických enzymů, celé řady prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku a dusíku. Pomáhají indukovat zánět a produkují signální molekuly, které aktivují ostatní buňky IS a rekrutují je do místa infekce. Důležitá je i jejich scavengerová funkce, kdy odklízí buněčnou debris a mrtvé buňky. Kromě jiného také exprimují MHC II. třídy a dokážou proto prezentovat Ag a indukovat adaptivní imunitní odpověď. Produkují také celou řadu cytokinů a modulátorů – např. IL-1, IL-8, IL-12, TNF, GM-CSF a interferony. V thymu jsou nezbytné pro vyzrávání T lymfocytů. Jsou plně funkční až po aktivaci IFN-γ nebo TNF. Účastní se obrany proti intracelulárním mikroorganismům spolu s Th1 buňkami. Vzájemným působením s Th1 lymfocyty se také podílejí na imunopatologické reakci opožděného typu (DTH) a buněčné cytotoxické reakci (Hořejší a Bartůňková, 2009).

IC-21 buňky sdílí mnoho vlastností s normálními myšími makrofágy a také exprimují jejich specifické Ag. Mají fagocytární a cytolytické schopnosti. Produkují velké množství kyselé fosfatázy a lysozymů. Exprimují také FcR a C3R. Ve vysoké míře fagocytují uhlíkové částice a červené krvinky. Pro schopnost stabilního růstu in vitro se využívají pro studium antivirové imunity a imunitní odpovědi. Mnoho vlastností makrofágů u nich přetrvává po několik stovek generací in vitro (Mauel a Defendi, 1971; Walker a Demus, 1975).

Dosud není známo, které signální dráhy se aktivují v makrofázích po infekci virem KE, ale je prokázáno, že se virus dobře replikuje v makrofágové linii IC-21 (Ahantarig a kol., 2009). Klíštěcí sliny mají schopnost inhibovat produkci zánětlivých cytokinů a oxidu dusnatého makrofágy (Gwakisa a kol., 2001).

1.3.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou stejně jako makrofágy buňky přirozené imunity. Propojují přirozenou a adaptivní imunitu a jsou považovány za profesionální APC. V organismu se vyskytují v nezralé i zralé formě.

V případě infekčního podnětu se z nezralých DC stávají zralé a přesunují se z tkání do lymfatických uzlin. Zralé DC ztrácí schopnost pohlcovat částice z okolí a zvyšuje se u nich exprese MHC proteinů a kostimulačních molekul (CD80, CD86), čímž se mění na účinné APC. Zralé DC žijí asi 2 až 3 dny a poté hynou apoptózou. Zralé DC produkují celou řadu cytokinů (IL-1, IL-6, TNF a IL-12), které jsou potřebné pro optimální stimulaci diferenciace efektorových T lymfocytů. Po setkání s viry produkují také velká množství interferonů (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Dendritické buňky, konkrétně Langerhansovy buňky kůže, jsou prvními antigen prezentujícími buňkami, jež vystavují antigeny viru klíšťové encefalitidy T lymfocytům. Podílí se také na transportu viru z podkoží do spádových lymfatických uzlin (Málková a Filip, 1968).

Klíštěcí sliny inhibují maturaci DC a jejich migraci do spádových mízních uzlin. Také je u nich snížená schopnost prezentovat antigen. DC vystavené klíštěcím slinám navíc polarizují vývoj pomocných T lymfocytů směrem k Th2 subpopulaci (Skallová a kol., 2008).

1.4 Přirozená imunita a flavivirová infekce

1.4.1 Rozpoznání virových struktur hostitelskou buňkou

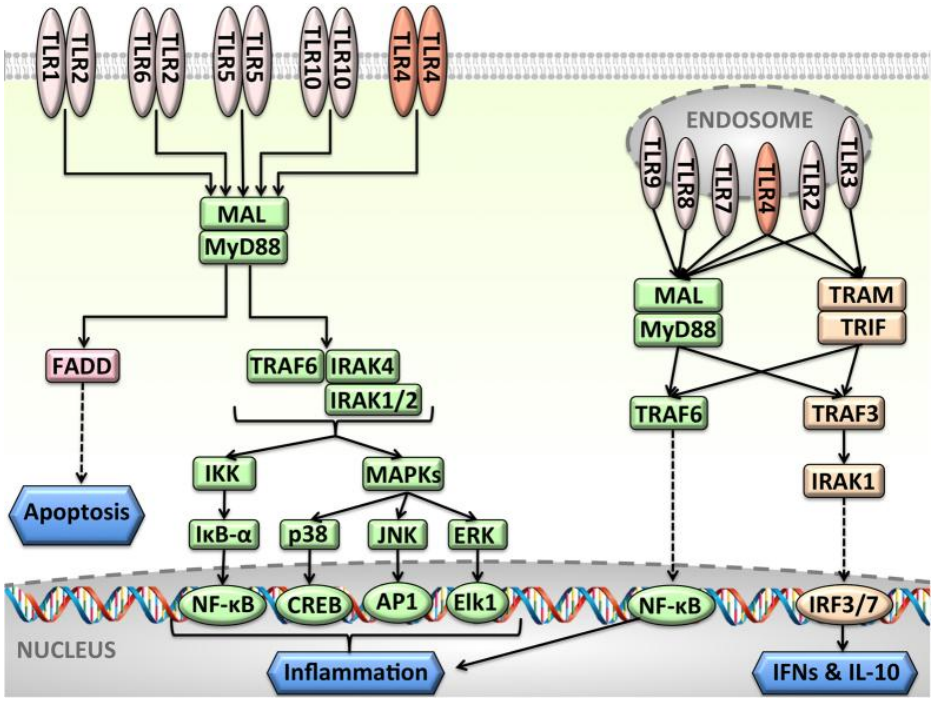
Viry mají genom tvořený DNA nebo RNA. Jak bylo uvedeno výše, v případě klíšťové encefalitidy se jedná o jednořetězcovou molekulu RNA. Různé strukturní složky virů, včetně RNA a povrchových glykoproteinů, jsou rozpoznávány hostitelskými buňkami jako tzv. PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) pomocí TLRs a dalších PRRs (Pattern Recognition Receptors) jako jsou NLRs a RLRs (nucleotide oligomerization domain-like receptors, retinoic acid-inducible gene I-like receptors) (Thompson a kol., 2011). Podíl na rozpoznání virových nukleotidů mají především TLR-3, TLR-7, TLR-8 a TLR-9. Rozpoznání virových složek pomocí PRRs aktivuje několik signálních drah vedoucích k produkci IFN typu I a různých cytokinů a chemokinů (Akira a kol., 2006).

Virová DNA je rozpoznávána TLR-9 a virová RNA receptory TLR-3, myším TLR-7 a lidským TLR-8. Při replikaci viru klíšťové encefalitidy vzniká jako intermediát dvouvláknová RNA, která je rozpoznána receptorem TLR-3. dsRNA je silným induktorem IFN typu I (Alexopoulou a kol., 2001).

TLR-3 je specificky exprimován na DC, které fagocytují umírající buňky, ale nevyskytuje se na plazmacytoidních DC. Dále je rozšířen na různých typech epiteliálních buněk, které mají bariérovou funkci. TLR-3 je také silně exprimován v mozku, hlavně na astrocytech, kde má specifickou roli v odpovědích na viry způsobující encefalitidy. Jedinci s funkční variantou genu pro TLR-3 jsou náchylnější k infekci virem KE (Mickiené a kol., 2014).

Virové glykoproteiny mohou být rozpoznávány pomocí receptorů TLR-2 a TLR-4, což většinou vede k produkci prozánětlivých cytokinů, ale ne IFN typu I. To má za následek spíše vznik zánětu než antivirového prostředí (Akira a kol., 2006).

Obecně se navázáním ligandu na TLR spustí kaskáda reakcí, která vede k indukci genů podílejících se na antimikrobiální obraně hostitele. Po navázání ligandu prochází TLR konformačními změnami, které jsou potřebné pro navázání adaptorových molekul na TIR doménu TLR. Rozlišujeme 4 druhy adaptorových molekul – MyD88, TRIF, TIRAP a TRAM. MyD88 a TRIF jsou zodpovědné za aktivaci odlišných signálních drah vedoucích k produkci prozánětlivých cytokinů nebo IFN typu I (Akira a kol., 2006).



Obr. 3: TLR signální dráha (Guven-Maiorov a kol., 2015)

MyD88 je zásadní pro signalizaci ze všech TLR kromě TLR-3. Signalizační kaskáda vede k aktivaci NF-κB a MAPK a následně k indukci genů účastnících se prozánětlivé odpovědi (Akira a kol., 2006; Brown a kol., 2011).

Kromě NFκB také transkripční faktor IRF-5 reguluje expresi genů pro cytokiny (Takaoka a kol., 2005). IRF-5 se přemístí do jádra po stimulaci s TLR ligandy a váže tam potenciální ISRE (IFN-stimulated response element) motivy, které jsou přítomné v promotorových oblastech genů pro cytokiny (Akira a kol., 2006).

Navázáním ligandu na TLR-3, TLR-4, TLR-7 a TLR-9 se spouští signální dráhy vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NF-κB a IRF-3 a k produkci IFN typu I a prozánětlivých cytokinů (Takeda a Akira 2005; Akira a kol., 2006; Brown a kol., 2011).

Nejčastějším mechanismem přirozené imunity proti virové infekci je produkce interferonů I. typu – IFN-α/IFN-β. Na receptory TLR-3, TLR-7, RIG-I a MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) se navážou např. dsRNA vznikající při virové replikaci a 5´-trifosfát ssRNA, což spustí signalizaci vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů, včetně IRF-3/IRF-7, ATF2/c-Jun, NF-κB, AP-1 či NFAT s následnou indukcí IFN-β a prozánětlivých cytokinů (Hatada a kol., 2000; Mogensen a Paludan, 2001; Shi, 2012; Kumar a kol., 2011). Virovou infekcí mohou být aktivované i další signální dráhy, včetně JAK/STAT a cAMP/PKA/CREB (Shaywitz a Greenberg, 1999; Liu a kol., 2004; Shi, 2012)

1.4.2 Signální dráhy aktivované v buňkách přirozené imunity

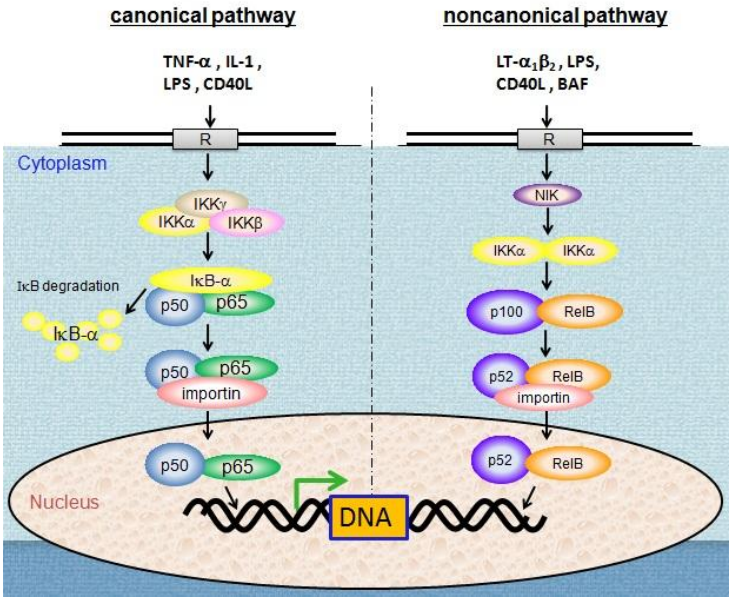
1.4.2.1 Signální dráha NF-κB

NF-κB/Rel proteiny zahrnují NF-κB p52/p100, NF-κB p50/p105, c-Rel, RelA/p65 a RelB. Tyto proteiny fungují jako dimerické transkripční faktory, které regulují expresi genů ovlivňujících celou řadu biologických procesů – např. přirozenou a adaptivní imunitu, zánět, reakci na stres, vývoj B buněk atd. Rozlišujeme klasickou a alternativní dráhu aktivace NF-κB.

V klasické dráze jsou NF-κB/Rel proteiny vázány a inhibovány IκB proteiny. Aktivací IKK komplexu (IKKβ, IKKα a NEMO) prostřednictvím prozánětlivých cytokinů, LPS, růstových faktorů či receptorů pro Ag se fosforylují proteiny IκB. Fosforylace IκB vede k jeho ubikvitinaci a degradaci v proteasomu. Uvolní se

NF-κB/Rel komplexy. Aktivní komplexy NF-κB/Rel jsou dále aktivovány posttranslační modifikací. Poté se přemístí do jádra, kde samostatně nebo v kombinaci s jinými transkripčními faktory (AP-1, Ets a STAT) indukují expresi cílového genu.

V alternativní NF-κB dráze jsou komplexy NF-κB2 p100/RelB inaktivní v cytoplazmě. Signalizace prostřednictvím receptorů jako LTβR, CD40 a BR3 aktivuje kinázu NIK, která opět aktivuje IKKα komplexy tím, že fosforyluje C-terminální zbytky v NF-κB2 p100. To vede k jeho ubikvitinaci a zpracování v proteasomu na NF-κB2 p52. Vznikají transkripčně kompetentní NF-κB p52/RelB komplexy, které se přemisťují do jádra a indukují expresi cílových genů (Hayden a Ghosh, 2008; Perkins, 2006; Sun, 2012).



Obr. 4: Schéma klasické a alternativní aktivace dráhy NF-κB (Horie a Umezawa, 2012)

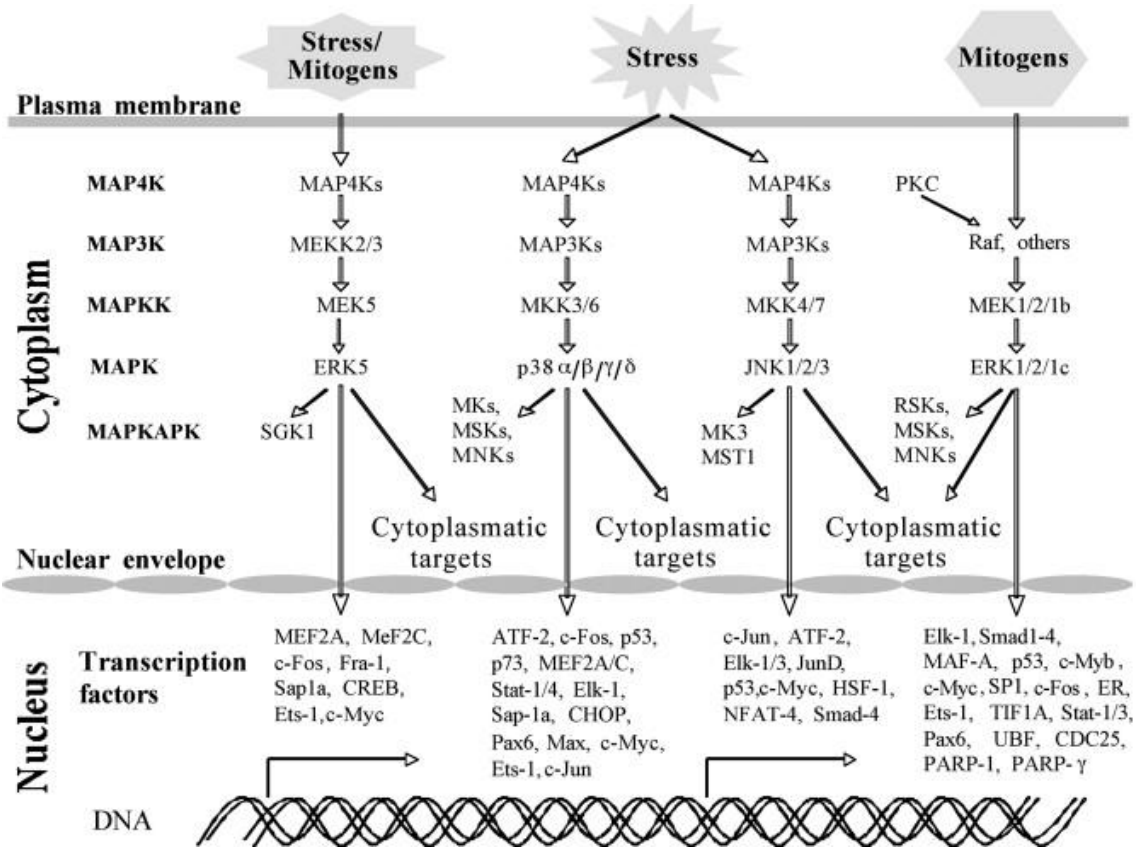
1.4.2.2 Signální dráha MAPK/JNK

MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) jsou vysoce konzervovanou rodinou serin/threonin proteinkináz, která se podílí na celé škále základních buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace, pohyb, stresová odpověď, apoptóza a přežívání. Obecně MAPKs zahrnují Erk1/2 (extracellualr signal-regulated kinase 1 a 2), JNK1-3

(c-Jun N-terminal kinases)/SAPK1A, 1B, 1C (stress activated protein kinases), izoformy p38 (p38α, β, γ a δ) a Erk5.

MAPKKKs (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase) jsou stimulovány celou řadou extracelulárních stimulů (mitogeny, cytokiny, růstové faktory atd.) prostřednictvím na receptorech závislých i nezávislých mechanismů. MAPKKKs poté fosforylují a aktivují MAPKKs, které zase fosforylují a aktivují MAPKs.

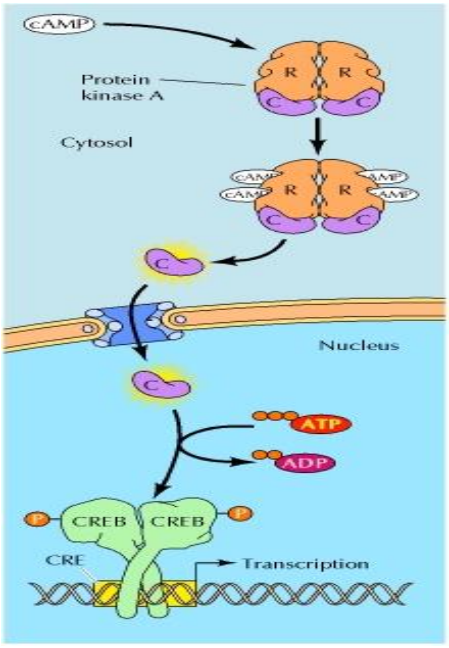
Aktivace MAPK vede k fosforylaci a aktivaci specifických MAPK-aktivovaných proteinkináz – např. členové rodiny RSK, MSK či MNK. Funkcí těchto proteinkináz je zesilovat signál a zprostředkovávat regulaci celé řady biologických procesů prostřednictvím různých MAPKs (Arthur a Ley, 2013; Cargnello a Roux, 2011; Plotnikov a kol., 2011).



Obr. 5: Schéma MAPK (Plotnikov a kol., 2011)

1.4.2.3 Signální dráha cAMP/PKA

Zvýšení hladiny cAMP v buňkách aktivuje transkripci specifických cílových genů, které obsahují regulační sekvence CRE (cAMP response element). Vzniklý signál je přenášen z cytoplazmy do jádra katalytickou podjednotkou proteinkinázy A (PKA), která je schopná vstoupit do jádra po uvolnění regulační podjednotky. PKA poté uvnitř jádra fosforyluje transkripční faktor CREB (CRE-binding protein), což vede k aktivaci cAMP-indukovatelných genů. cAMP signalizační dráha se podílí na regulaci proliferace, přežívání a diferenciace celé řady živočišných buněk (Cooper, 2000).

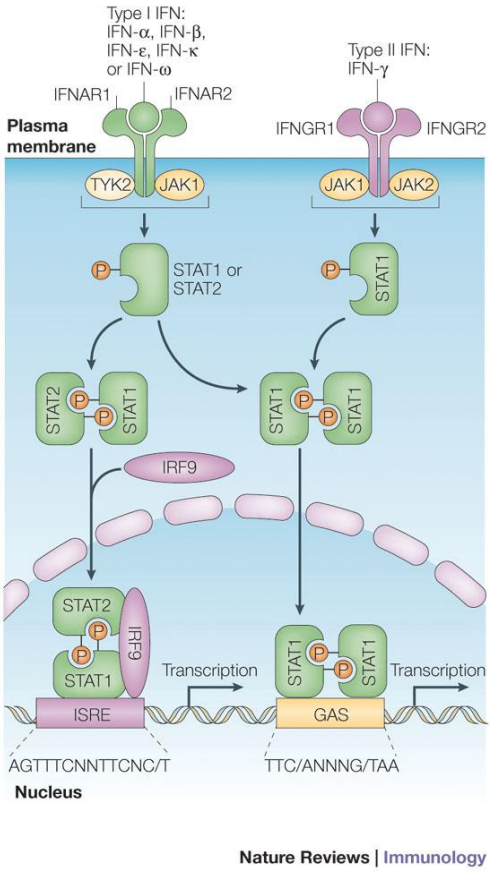


Obr. 6: Schéma cAMP/PKA (Cooper, 2000)

1.4.2.4 Signální dráha JAK/STAT

Signální dráha JAK/STAT (Janus activated kinase/signal transducer and activators of transcription) je hlavní drahou, která se aktivuje po navázání IFN na jeho receptor. Signál se přenáší do jádra k příslušným cílovým genům (Darnell a kol., 1994).

JAKs a STATs molekuly jsou součástí mnoha cytokinových receptorů. Regulují růst, přežívání, diferenciaci a odolnost vůči patogenům. Navázání cytokinů indukuje dimerizaci receptoru, aktivaci asociovaných JAKs, které fosforylují samy sebe a receptor. Fosforylovaná místa na receptoru a JAKs poskytují místa pro SH2-obsahující STATs (např. STAT3) a pro SH2-obsahující proteiny a adaptory, které propojují receptor s MAP kinázou, PI3K/Akt a dalšími buněčnými drahami. Fosforylované STATs dimerizují a přemisťují se do jádra, kde regulují transkripci cílových genů (Rawlings a kol., 2004).



Obr. 7: Schéma JAK/STAT signalizační dráhy (Platanias, 2005)

Nejčastějším typem odpovědi hostitele na virovou infekci je produkce interferonů I. typu. Navázáním různých PAMPs na receptory se spouští signalizace vedoucí k aktivaci několika transkripčních faktorů a následné indukci IFN-β a dalších prozánětlivých cytokinů (Carey, 1998). K dalšímu zesílení imunitní odpovědi dochází

po navázání sekretovaného IFN-α/β na receptor (IFNAR-1/IFNAR-2). To vede k aktivaci JAK1 a Tyk2, které fosforylují intracelulární domény receptorových podjednotek a vytváří místo pro STAT2. JAKs poté fosforylují STAT1 i STAT2, které heterodimerizují a váží se na IRF9/p48 a společně tvoří komplex ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3). ISGF3 se přemístí do jádra a váže se k ISRE sekvencím, které se nalézají v promotor/enhancerových oblastech interferon-stimulujících genů. To vede k transkripci a translaci těchto genů a v buňce se vytváří antivirový stav (Platanias, 2005; Schindler a kol., 2007).

2 Materiál a metody

2.1 Materiál

2.1.1 IC-21

K experimentům byla využita myší makrofágová linie IC-21. Tato buněčná linie byla odvozena transformací peritoneálních makrofágů myši kmene Balb-c a C57 B1 virem SV40 (simian virus 40).

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI s přídavkem 10% bovinního fetálního séra (BOFES), amphotericinu B v koncentraci 0,23 μg/ml, penicilinu v koncentaci 100 jednotek na mililitr, streptomycinu v koncentraci 100 μg/ml, 0,1% 2-merkaptoetanolu (ME) a 1% L-glutaminu (GL) při 37 °C.

2.1.2 Myeloidní dendritické buňky

DC byly derivované z kostní dřeně za přítomnosti růstového faktorů GM-CSF (20 ng/ml) v kompletním RPMI médiu (stejné složení jako pro IC-21 buňky) po dobu 8 dní dle Lutze (Lutz et al., 1999).

2.1.3 Vir klíšťové encefalitidy

K infekci makrofágů a dendritických buněk byl použit virus klíšťové encefalitidy kmene Neudörfl a Hypr pomnožený na opičích Vero buňkách (původem z buněk ledvin kočkodana zeleného). Vero buňky byly infikovány virem KE (mozkovou suspenzí) po dobu 48 hodin (kdy byly pozorovány první známky cytopatického efektu), a poté bylo sebráno kondiciované médium. Následovala titrace viru (kondiciovaného média) na buňkách PS (porcine stable kidney cell line). Titr takto připravené virové suspenze

dosahoval 10^7 PFU/ml a 5 x 10^6 PFU/ml pro kmen Neudörfl a 4,4 x 10^6 PFU/ml a 2,9 x 10^7 PFU/ml pro kmen Hypr. Kondiciované médium z neinfikovaných Vero buněk, připravené paralelně s virovou suspenzí, pak bylo používáno jako kontrola. Množství použité virové suspenze záleželo na výsledné MOI (multiplicity of infection), tzn., kolik virových částic připadá na jednu buňku.

2.1.4 Klíštěcí sliny

Sliny byly získány z dospělých samic klíštěte *Ixodes ricinus*, filtrovány přes 0,2μm filtr a uchovávány při teplotě -70 °C. Obsah proteinů ve slinách byl stanoven na 500 μg/ml pomocí metody dle Bradforda (Bradford, 1976). V experimentech byly sliny použity v koncentraci 10 μg/ml.

2.1.5 Aktivátory

LPS (lipopolysacharid, Sigma) byl použit v koncentraci 100 ng/ml. Používal se k aktivaci NF-κB signální dráhy a cAMP/PKA signální dráhy.

IQ (Imiquimod, InvivoGen) byl použit v koncentraci 2 μg/ml. Používal se při aktivaci signální dráhy JAK/STAT.

IFN-β (interferon beta, PBL interferon source) byl použit v koncentraci 100 U/ml. Používal se také k aktivaci signální dráhy JAK/STAT.

PMA (Phorbol-myristoyl acetát, Sigma) byl použit v koncentraci 1 μM. Používal se k aktivaci signální dráhy MAPK/JNK a cAMP/PKA.

2.1.6 Plazmidy

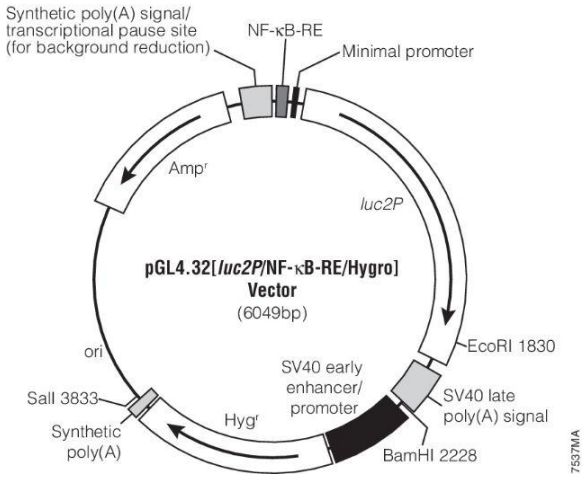
Duální luciferázová reportérová esej je založena na měření dvou luciferázových aktivit s využitím dvou plazmidů. Reportérový plazmid obsahuje gen pro luciferázu

ze světlušky (Photinus Pyrali) a referenční plazmid obsahuje gen pro renillovou luciferázu (Renilla reniformis). Renillová luciferáza slouží jako interní kontrola pro normalizaci dat získaných ze světluškové luciferázy. K transfekci se využívaly plazmidy řady pGL4 od společnosti Promega.

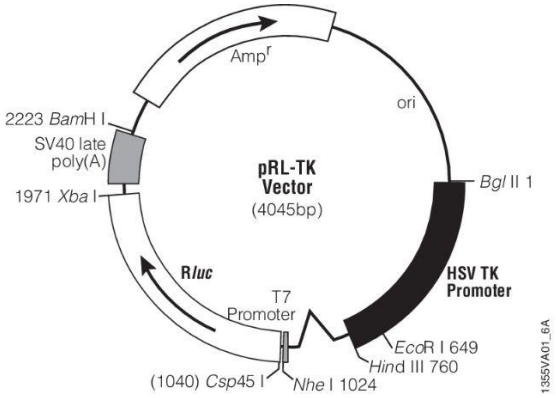
Přehled použitých reportérových plazmidů je uveden v tabulce 1. Schématická mapa reportérového plazmidu pro NF-κB je znázorněna na obrázku 8. Jako referenční plazmid (renilla) byl použit pRL-TK (obrázek 9).

Plazmid	**Activator/pathway**	**Transcription factor**
pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro]	cAMP/PKA	CREB
pGL4.32[luc2P/NF-kB-RE/Hygro]	NF-κB	NF-κB
pGL4.44[luc2P/AP1-RE/Hygro]	MAPK/JNK	AP-1
pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro]	JAK/STAT	STAT-1/STAT-2

Tab. 1: Přehled použitých reportérových plazmidů



Obr. 8: Schématická mapa reportérového plazmidu pro NF-κB (Promega)



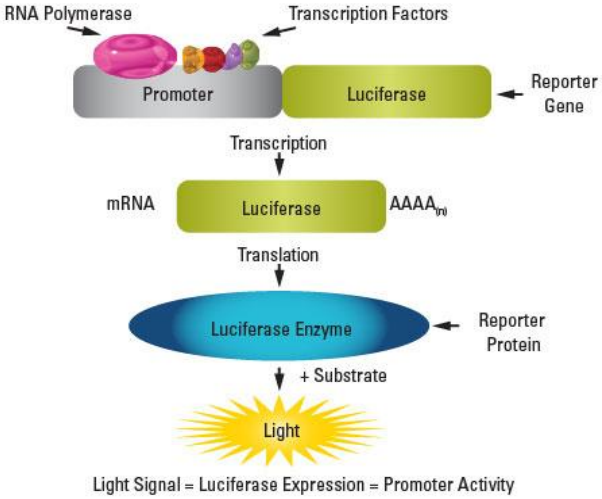
Obr. 9: Schématická mapa referenčního plazmidu (Promega)

2.2 Metody

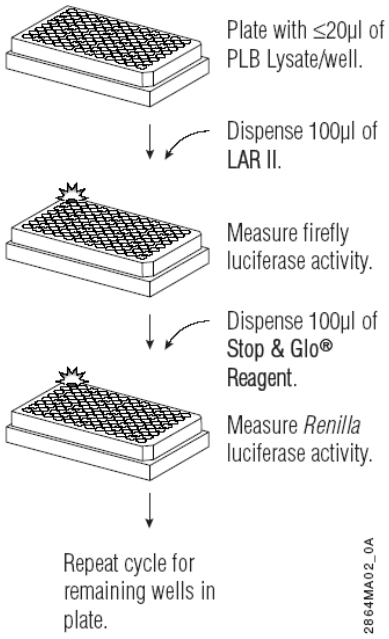
2.2.1 Měření aktivace signálních drah pomocí duální luciferázové reportérové eseje

2.2.1.1 Princip duální luciferázové reportérové eseje

Duální luciferázová reportérová esej byla hlavní metodou v mé diplomové práci. Jedním z cílů mé práce byla optimalizace této metody pro měření aktivity signálních drah.



Obr. 10: Princip luciferázového reportérového systému (Dobbs a kol., 2013)



Obr. 11: Princip duálního luciferázového reportérového systému (Promega)

Na obrázku 10 je zobrazen princip luciferázového reportérového systému. Plazmidy řady pGL4 obsahují v promotorové oblasti regulační element (specifický pro jednotlivé transkripční faktory), který po aktivaci spouští transkripci luciferázového reportérového genu. Následně dochází k translaci reportérového genu a měří se aktivita luciferázy. Naměřená luminiscence odpovídá aktivitě testovaného transkripčního faktoru.

Pojem „duální reportérový“ znamená simultánní expresi a měření dvou samostatných reportérových enzymů v rámci jednoho systému (obr. 11). V duální luciferázové reportérové eseji jsou aktivity světluškové luciferázy (Photinus pyralis) a renillové luciferázy (Renilla reniformis) měřeny postupně z jednoho vzorku. Aktivita světluškové luciferázy se měří po přidání Luciferase Assay Reagent II (LAR II), kdy vznikne stabilizovaný luminiscenční signál. Po kvantifikaci světluškové luminiscence je tato reakce ukončena přidáním roztoku STOP&GLO, který zároveň umožní měření aktivity renillové luciferázy. STOP&GLO Reagent také vytváří stabilizovaný signál z renillové luciferázy, který se rozkládá pomalu v průběhu měření.

2.2.1.2 Izolace plazmidů

Plazmidy řady pGL4 byly množeny v kompetentních buňkách Stb12. Prvním krokem byla transformace Stb12 (Invitrogen). Plazmidy se naředily v roztoku TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 1 nM EDTA) na finální koncentraci 100 pg DNA v 1 µl. K 50 µl Stb12 buněk se přidal 1 µl naředěné plazmidové DNA. Následovala 30minutová inkubace na ledu, poté 15sekundová inkubace při 42 °C (tepelný šok). Následně se buňky přemístily na 2 minuty na led. K buňkám se přidalo 900 µl S.O.C. média při pokojové teplotě a nechaly se inkubovat 90 minut na třepačce při 30 °C. Potom se 200 µl roztoku vyseje pomocí hokejky na misku s agarem v LB médiu se 100 µg/ml ampicilinu a nechá se inkubovat přes noc při 30 °C.

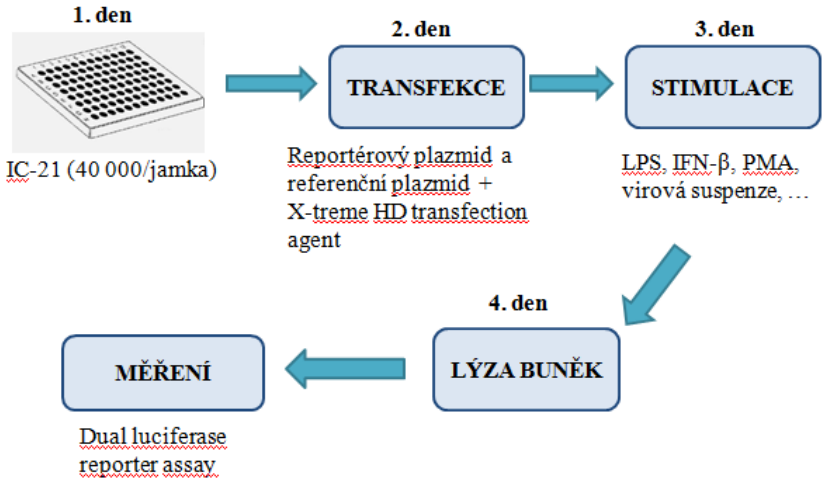
Druhý den se z agaru pomocí kličky odebrala narostlá kolonie a rozmíchala se v 1 ml LB média se 100 µg/ml ampicilinu. Roztok se nechal přes den množit na třepačce při 30 °C. Následně bylo 10 µl suspenze buněk přeneseno do Erlenmeyerovy baňky obsahující 100 ml LB média a ponecháno přes noc namnožit. Další den se z buněk vyizolovaly plazmidy pomocí Qiagen Plasmid Midi Kit dle instrukcí výrobce (Qiagen Bioinformatics). Koncentrace DNA byla měřena na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific).

2.2.1.3 Transfekce a aktivace buněk

První den byly založeny buňky IC-21 do 96-jamkového panelu v triplikátech tak, aby v každé jamce bylo 40 000 buněk. Buňky byly kultivovány ve 100 µl transfekčního média (RPMI s přídavkem 10% BOFES, 1% NEAA (non-essential amino acid)) v inkubátoru při 37 °C s 5% CO_2. Druhý den byla k buňkám přidána transfekční směs. Plazmidy řady pGL4 a pRL-TK se naředily v OPTI-MEM médiu na koncentraci 20 ng/µl a smíchaly se s X-tremeGENE^{TM} HP DNA Transfection Reagent (lipid) (Roche). Tato směs se nechala inkubovat při pokojové teplotě 30 minut. Poté se z ní přidalo 5 µl do každé jamky (100 ng plazmidové DNA na jamku). Transfekované buňky se nechaly přes noc inkubovat při 37 °C, 5% CO_2. Třetí den se buňky stimulovaly

pomocí LPS, IFN-β, IQ, PMA nebo virovou suspenzí. Před samotným přidáním aktivátoru bylo u buněk vyměněno transfekční médium za assay médium (RPMI s přídavkem 0,5% BOFES, 1% NEAA a 1% ATB). Čtvrtý den byla změřena luciferázová aktivita.

Na obrázku 12 je zobrazeno schéma experimentu.



Obr. 12: Schéma experimentu (vlastní schéma)

2.2.1.4 Optimalizace podmínek

V rámci optimalizace byly testovány dva poměry reportérového a referenčního plazmidu, a to 10:1 a 20:1. Poměr X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent k DNA byl konstantní 3:1 (3 µl/1 µg DNA). Také bylo testováno dvojnásobné množství plazmidové DNA (200 ng DNA na jamku). Transfekce byla prováděna klasickou nebo reverzní metodou. Reverzní transfekce se lišila od klasické (popsané v podkapitole 2.2.1.3) tím, že buňky byly smíchány s transfekční směsí již první den.

2.2.1.5 Měření luciferázové aktivity pomocí kitu Dual-luciferase Reporter Assay (Promega)

Transfekované buňky se 24 hodin po stimulaci promyly 100 μl PBS. Poté bylo k buňkám přidáno 20 μl lyzačního roztoku a buňky se nechaly inkubovat 15 minut na třepačce. Následně byla po přidání vyvolávacích roztoků změřena luminiscence na multi-plate readeru (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek). Aktivita obou luciferáz se měřila sekvenčně v každém vzorku při integračním času 10 000 ms. Výsledná luciferázová aktivita je výsledkem poměru aktivity světluškové luciferázy k renillové luciferáze.

2.2.2 Měření aktivace signálních drah pomocí kitu PathScan® Intracellular Signaling Array (Chemiluminiscent Readout)

2.2.2.1 Princip metody

Další metodou, kterou jsme používali při měření aktivity signalizačních molekul, byla PathScan® Intracellular Signaling Array (Cell Signaling Technology). Tato metoda je založena na principu sendvičové imunoeseje. Array se provádí na sklíčku, které má místa pro 16 vzorků. Každý čtvereček (nitrocelulózová membrána) je pokryt protilátkami proti 18 důležitým a dobře charakterizovaným aktivovaným signálním molekulám (viz obr. 13). Protilátky rozeznávají fosforylovanou, anebo štěpenou formu těchto molekul. Tato array tedy umožňuje současnou detekci všech 18 signálních molekul v jediném vzorku. Následující obrázky ukazují schéma pokrytí protilátek na nitrocelulózové membráně a výčet jednotlivých molekul.

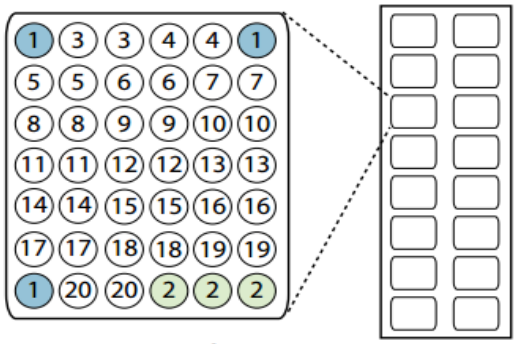


Figure 1. Target map of the PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Chemiluminescent Readout) #7323.

Intracellular Signaling

	Target	Phosphorylation Site	Modification
1	Positive Control	N/A	N/A
2	Negative Control	N/A	N/A
3	ERK1/2	Thr202/Tyr204	Phosphorylation
4	Stat1	Tyr701	Phosphorylation
5	Stat3	Tyr705	Phosphorylation
6	Akt	Thr308	Phosphorylation
7	Akt	Ser473	Phosphorylation
8	AMPKα	Thr172	Phosphorylation
9	S6 Ribosomal Protein	Ser235/236	Phosphorylation
10	mTOR	Ser2448	Phosphorylation
11	HSP27	Ser78	Phosphorylation
12	Bad	Ser112	Phosphorylation
13	p70 S6 Kinase	Thr389	Phosphorylation
14	PRAS40	Thr246	Phosphorylation
15	p53	Ser15	Phosphorylation
16	p38	Thr180/Tyr182	Phosphorylation
17	SAPK/JNK	Thr183/Tyr185	Phosphorylation
18	PARP	Asp214	Cleavage
19	Caspase-3	Asp175	Cleavage
20	GSK-3β	Ser9	Phosphorylation

Obr. 13: Schéma PathScan® Intracellular Array a seznam signalizačních molekul, které tato array umožňuje měřit

2.2.2.2 Infekce buněk virem KE

IC-21 byly založeny v počtu 800 000 buněk na jamku ve 24-jamkovém panelu. Další den byl k buňkám přidán virus kmene Neudörfl, Hypr (MOI 1) a odpovídající objem kondiciovaného média z Vero buněk. Po 1 až 3 hodinách po stimulaci byly buňky promyty vychlazeným PBS. Po odebrání PBS k nim byl přidán lyzační pufr spolu s koktejlem proteázových inhibitorů (Sigma) a sodium orthovanadátem (Na_3VO_4) - inhibitor fosfatáz (Sigma).

Buněčné lyzáty byly poté aplikovány na sklíčko (array) a inkubovány přes noc. Po promytí bylo sklíčko inkubováno s biotinylovaným detekčním protilátkovým koktejlem. Streptavidinem-konjugovaná křenová peroxidáza a LumiGLO® Reagent byly poté použity k vizualizaci navázaných detekčních protilátek pomocí chemiluminiscence. Tato metoda se prováděla podle protokolu příslušného kitu od společnosti Cell Signaling Technology. Výsledná chemiluminiscence byla detekována v přístroji Aliance 4.7. Uvitec s programem Aliance a analýza byla provedena pomocí programu UVIBand.

Vzhledem k tomu, že tři protilátky použité v kitu (anti-HSP27, PARP a caspase-3) nerozeznávají myší proteiny (jen lidské), byly tyto vyjmuty z analýzy.

2.2.3 Měření aktivace signálních drah pomocí metody western blot

Western blot byl další metodou, která se využila na měření aktivace signálních drah.

2.2.3.1 Infekce virem KE

IC-21 byly založeny v počtu 800 000 buněk na jamku ve 24-jamkovém panelu. Další den byl k buňkám přidán virus kmene Hypr (MOI 1) a odpovídající objem kondiciovaného média z Vero buněk. Po 1 a 3 hodinách po stimulaci byly buňky promyty chlazeným PBS a lyzovány přidáním 80 μl RIPA pufru (Radio Immuno Precipitation Assay buffer) po dobu 5 minut na ledu. Supernatant byl následně odebrán a centrifugován po dobu 10 minut (20 000g, 4 °C) a poté přenesen do čistých mikrozkumavek a zamražen k pozdějšímu použití.

2.2.3.2 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

Proteiny byly separovány v polyakrylamidovém gelu dle Coligana (Coligan a kol., 1992). 8% polyakrylamidové gely pro elektroforézu byly připraveny následujícím způsobem. Roztok pro running gel byl nalit do sestavené aparatury, překryt isobutylalkoholem a nechán přibližně hodinu polymerovat. Poté byl isobutylalkohol vymyt destilovanou vodou a na running gel byl nanesen stacking gel. Do gelu byl zasunut hřebínek a opět se nechal polymerizovat přibližně 15 minut.

Takto připravený gel byl umístěn do elektroforetické aparatury naplněné elektroforetickým pufrem. Buněčné lyzáty byly smíchány s 4x Laemmli pufrem v poměru 3:1 a inkubovány 3 minuty při 95 °C. Vzorky byly naneseny ve stejném

objemu a následně separovány v elektroforetickém poli při 80 mA, 250 V (pro 2 gely) v elektroforetické aparatuře (Biorad).

2.2.3.3 Western blot

Rozdělené proteiny z gelu byly přeneseny na nylonovou membránu v elektroblotovací aparatuře dle Towbina (Towbin, 1979). V blotovacím pufru byl sestaven tzv. blotovací sendvič: houbička, 3 filtrační papíry, membrána navlhčená v methanolu, polyakrylamidový gel, 3 filtrační papíry a houbička. Připravený sendvič byl vložen do blokovací aparatury. Přenos proteinu na membránu probíhal 2 hodiny při 126 mA a 300 V.

Membrána byla následně opláchnuta v roztoku TBS s Tweenem (0,1%) (TBST) a vyblokována v blokovacím roztoku (TBST s 5% odtučněným mlékem) 1 hodinu při pokojové teplotě na třepačce. Membrána byla poté inkubována přes noc s primární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku (dle údajů výrobce) při 4 °C na rotátoru.

Další den byla membrána promyta v TBST 15 minut a dvakrát 5 minut na třepačce při pokojové teplotě. Následně byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou po dobu 45 minut na třepačce při pokojové teplotě. Poté byla promývána v TBST třikrát 5 minut.

Proteiny byly vizualizovány chemiluminiscenční metodou za použití WesternBright^{TM} Quantum (Advansta) dle návodu výrobce. Chemiluminiscence byla detekována v přístroji Aliance 4.7. Uvitec s programem Aliance. Výsledné snímky byly poté analyzovány v programu ImageJ.

V pokusech byly použity primární králičí protilátky proti Akt a Erk1/2 proteinu a jejich fosforylovaným formám (Akt S473 a Erk1/2 T202/Y204). Použité sekundární protilátky byly anti-králičí. Všechny protilátky byly od firmy Cell Signaling Technology.

2.3 Statistická analýza

Výsledky byly statisticky zpracovány v programu GraphPrism 5.0. Pro vyhodnocení výsledků z duální luciferázové reportérové eseje byla využita statistická metoda jednocestné analýzy variance (ANOVA) a pro výsledky z PathScan Intracellular Signaling Array tzv. dvoucestné ANOVA. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro $p < 0,05$, dvě pro $p < 0,01$, tři pro $p < 0,001$ a čtyři pro $p < 0,0001$). V grafech je zobrazena směrodatná odchylka.

3 Výsledky

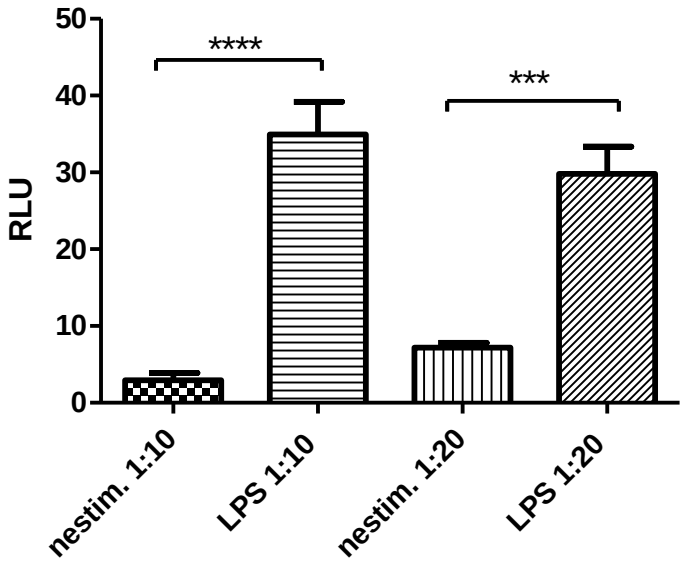
3.1 Optimalizace metody využívající duální luciferázovou reportérovou esej na měření aktivity signálních drah v buňkách IC-21

Jedním z cílů mé práce bylo optimalizovat metodu využívající duální luciferázovou reportérovou esej k měření aktivity signálních drah v myší makrofágové linii IC-21 a v primárních dendritických buňkách. Pro optimalizaci metody byly buňky transfekovány plazmidem pGL4.32, který umožňuje měřit aktivaci signální molekuly NF-κB.

Během optimalizace se ukázalo, že primární dendritické buňky nejsou vhodné pro transfekci. Byly vyzkoušeny různé kombinace transfekčních podmínek, avšak ani jedna nedosáhla uspokojivé účinnosti. Z tohoto důvodu jsme v experimentech na dendritických buňkách nepokračovali a všechny níže uvedené výsledky byly získáné z buněk IC-21.

Jako první byl v rámci optimalizace testován vhodný poměr reportérového (pGL4) a referenčního plazmidu (pRL-TK). Byly vyzkoušeny 2 poměry – 10:1 a 20:1. Následující graf (obr. 14) zobrazuje výsledky z měření aktivace signální dráhy NF-κB. Buňky byly transfekovány plazmidem pGL4.32 a pRL-TK a stimulovány pomocí LPS. 18 hodin po aktivaci byl připraven buněčný lyzát.

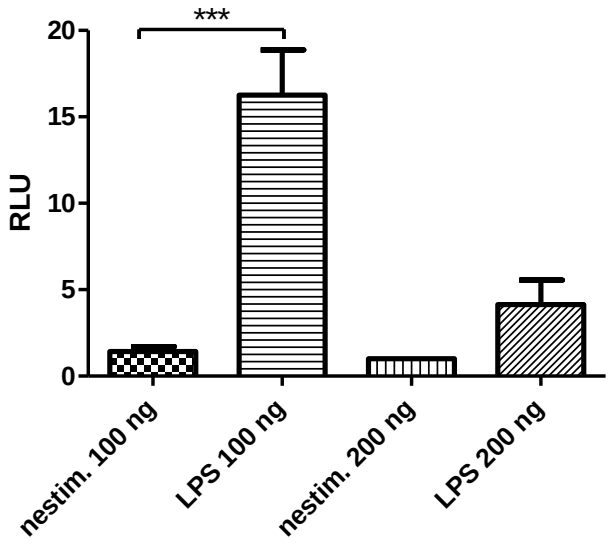
Poměr světluškové a renillové luminiscence je vyjádřen v grafech v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) a odpovídá aktivitě NF-κB.



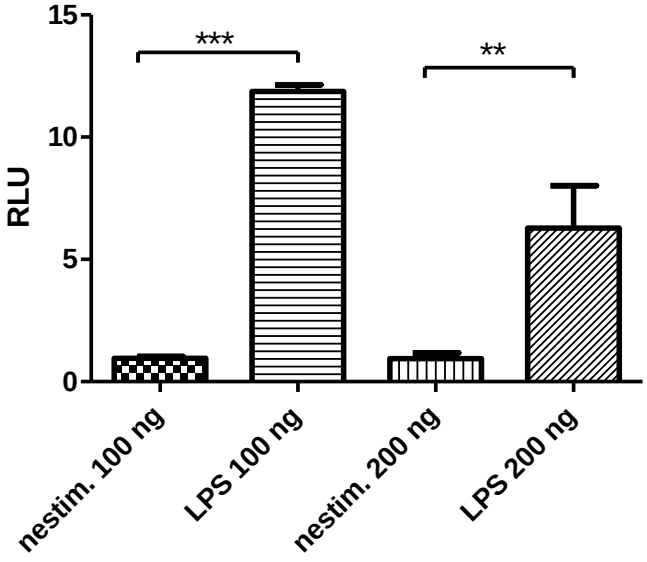
Obr. 14: Optimalizace - aktivace signální dráhy NF-κB po stimulaci LPS

Z obrázku 14 je patrné, že při poměru reportérového a referenčního plazmidu 10:1 došlo k výraznějšímu nárůstu luminiscence ve vzorcích stimulovaných s LPS oproti vzorkům nestimulovaným, a proto byl v dalších experimentech používán tento poměr.

Dále bylo porovnáno použití standardního (100 ng) a dvojnásobného množství DNA (200 ng) použitého k transfekci. Buňky byly transfekovány plazmidem pGL4.32 a pRL-TK a lyzovány 18 hodin po přidání LPS. Zároveň byla porovnávána účinnost reverzní a klasické transfekce. Následující 2 grafy (obr. 15 a 16) zobrazují výsledky z měření luminiscence odpovídající aktivitě NF-κB.



Obr. 15: Optimalizace - aktivace signální dráhy NF-κB po stimulaci LPS – reverzní transfekce



Obr. 16: Optimalizace - aktivace signální dráhy NF-κB po stimulaci LPS – klasická transfekce

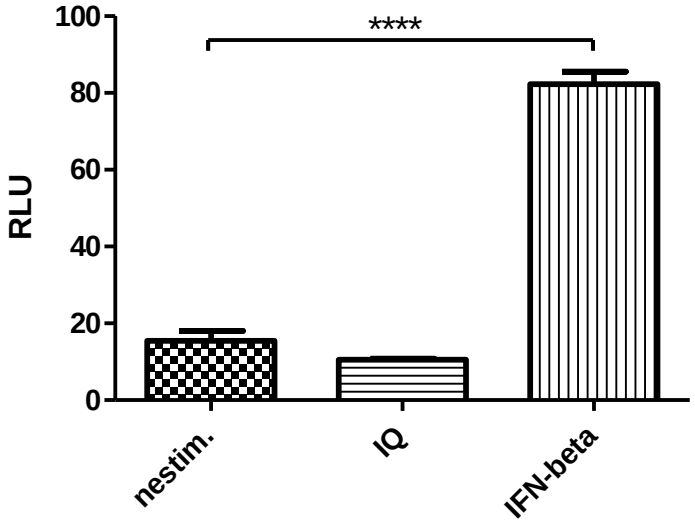
Z obou grafů vyplývá, že použití 100 ng DNA na jeden vzorek vykazuje lepší výsledky než dvojnásobné množství. Účinnost transfekce metodou klasickou a reverzní byla porovnatelná. Buňky se v dalších experimentech transfekovaly vždy klasickou metodou.

3.2 Testování funkčnosti dalších plazmidů

Na základě optimalizace byly stanoveny vhodné podmínky pro metodu duální luciferázové reportérové eseje, které byly následně použity při otestování funkčnosti dalších plazmidů a během následujících experimentů.

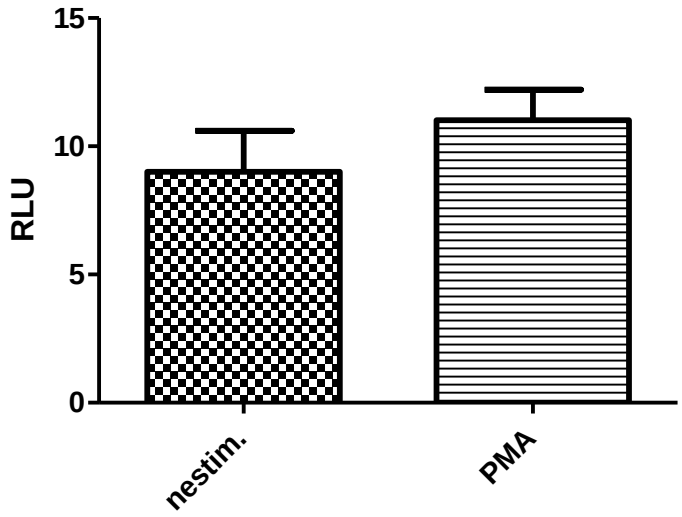
Buňky byly zakládány do 96-jamkového panelu v počtu 40 000 buněk na jamku a byly transfekovány klasickou metodou. Poměr reportérového a referenčního plazmidu byl 10:1 a poměr X-tremeGENE^{TM} HP DNA Transfection Reagent (lipid) k DNA byl 3:1 µl/µg DNA. Bylo použito 100 ng DNA na jamku.

Na dalším grafu (obr. 17) jsou zobrazeny výsledky aktivace signální dráhy JAK/STAT při použití plazmidu pGL4.45. Buňky byly stimulovány imiquimodem a IFN-β a lyzovány 16 hodin po aktivaci. U buněk stimulovaných IFN-β bylo pozorováno signifikantní zvýšení luminiscenčního signálu, zatímco u buněk stimulovaných IQ nikoliv.



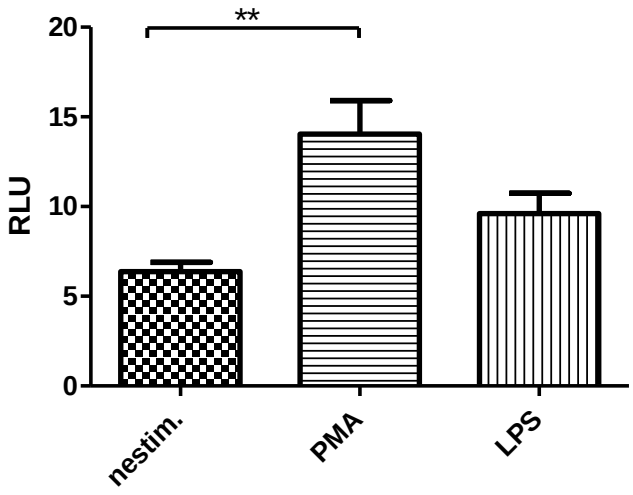
Obr. 17: Testování aktivace signální dráhy JAK/STAT po stimulaci IQ a IFN-β

Na obrázku 18 jsou zobrazeny výsledky z měření aktivace transkripčního faktoru AP-1. Byl použit plazmid pGL4.44 a buňky byly stimulovány pomocí phorbol-myristoyl acetátu (PMA) a lyzovány po 6 hodinách od aktivace. Bohužel došlo pouze k statisticky nevýraznému nárůstu luminiscenčního signálu v aktivovaných buňkách.



Obr. 18: Testování aktivace signální dráhy MAPK/JNK po stimulaci s PMA

Následující obrázek (obr. 19) znázorňuje výsledky naměřené luminiscence po aktivaci signální dráhy cAMP/PKA. Buňky byly stimulovány pomocí PMA a LPS a lyzovány 16 hodin po aktivaci. U buněk stimulovaných PMA byl zaznamenán větší nárůst luminiscenčního signálu než u buněk stimulovaných LPS.



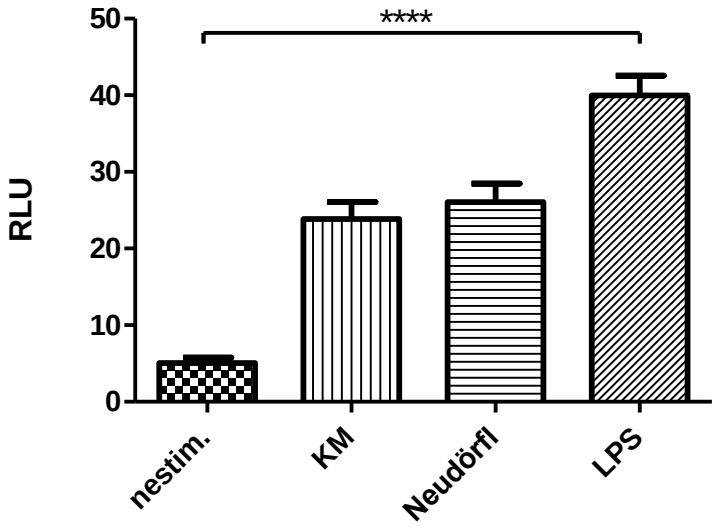
Obr. 19: Testování aktivace signální dráhy cAMP/PKA po stimulaci PMA a LPS

3.3 Měření aktivace vybraných signálních drah po infekci virem KE

Po optimalizaci metody a testu plazmidů následovalo testování aktivace transkripčních faktorů NF-κB a STAT1/STAT2 po infekci virem KE kmene Neudörfl.

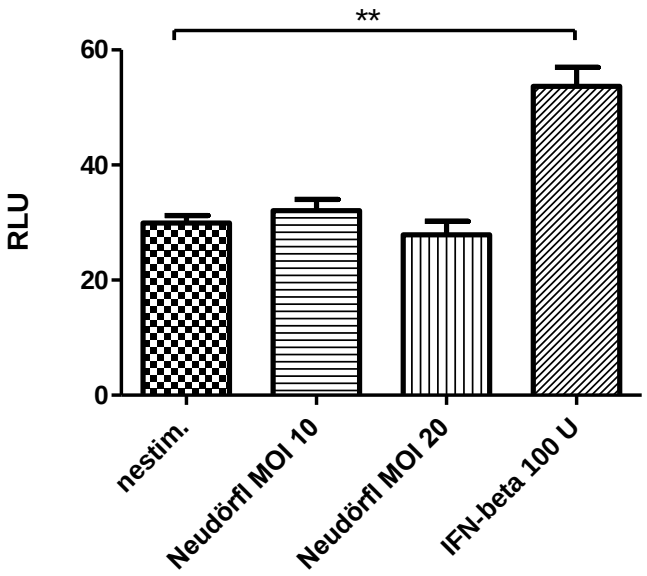
Na obrázku 20 jsou znázorněny výsledky aktivace signální dráhy NF-κB virem KE. Buňky byly stimulovány virem KE kmene Nedörfl při MOI 5 (5 virových částic na buňku). Jako kontrola k viru bylo použito kondiciované médium z Vero buněk a jako pozitivní kontrola bylo použito LPS. Buňky byly lyzovány 21 hodin po aktivaci.

Z grafu (obr. 20) je zřejmé, že buňky infikované virem vykazovaly zvýšenou luminiscenci, což odpovídá zvýšené aktivitě sledovaného transkripčního faktoru NF-κB. Bohužel srovnatelné zvýšení aktivity NF-κB bylo pozorováno rovněž po přidání kondiciovaného média. Ve vzorcích, kde bylo použito LPS ke stimulaci buněk, rovněž došlo k výraznému nárůstu NF-κB aktivity.



Obr. 20: Aktivace signální dráhy NF-κB po stimulaci virem KE kmene Neudörfl

Další signální dráhou, která se testovala, byla signální dráha JAK/STAT (obr. 21). Buňky byly stimulovány virem KE kmene Neudörfl při MOI 10 a MOI 20 a jako pozitivní kontrola bylo použito 100 jednotek IFN-β. Bohužel virus KE nevyvolal aktivaci JAK/STAT signální dráhy. Ve vzorcích, kde byl použit IFN-β, došlo k aktivaci STAT-1/STAT-2.

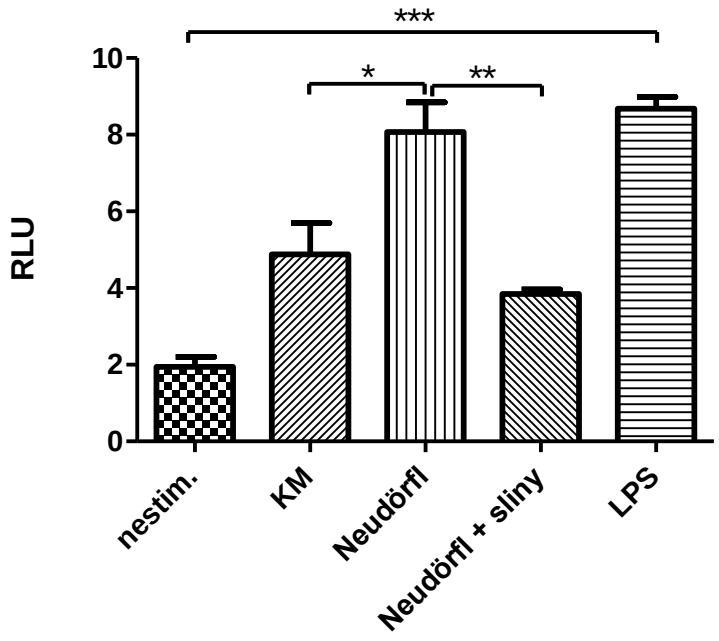


Obr. 21: Aktivace signální dráhy JAK/STAT po stimulaci virem KE kmene Neudörfl

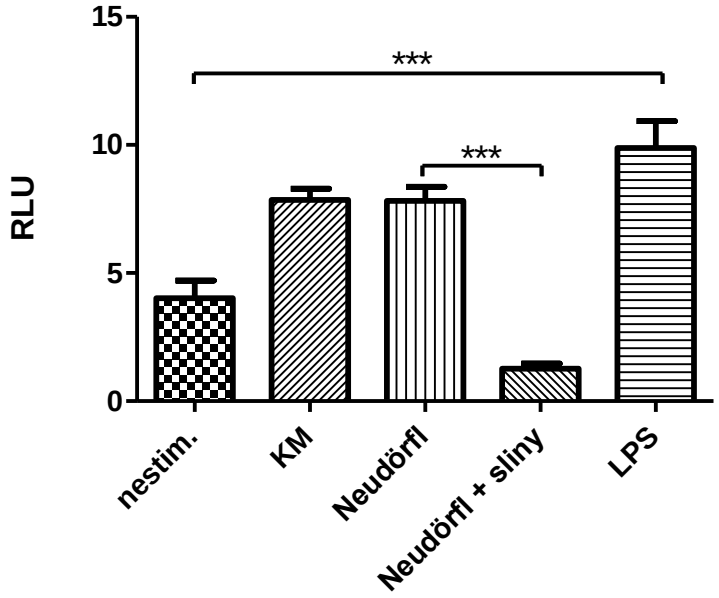
3.4 Vliv klíštěcích slin na aktivaci NF-κB, AP-1 a CREB vyvolanou virem KE

Dále byl zkoumán vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah NF-κB, MAPK/JNK a cAMP/PKA.

Na obrázcích 22 a 23 jsou znázorněny výsledky aktivace signální dráhy NF-κB. Buňky byly stimulovány virem KE kmene Neudörfl při MOI 5 (obr. 22) a MOI 25 (obr. 23). Jako negativní kontrola bylo opět použito kondiciované médium z Vero buněk a jako pozitivní kontrola bylo použito LPS. Klíštěcí sliny byly použity v koncentraci 10 μg/ml a byly přidány k buňkám dvě hodiny před samotnou infekcí virem. Lýza buněk následovala 24 hodin po aktivaci. Jak je z obrázku 22 (MOI 5) patrné, vir aktivoval transkripční faktor NF-κB stejně jako pozitivní kontrola. Naopak rozdíl v aktivitě NF-κB v buňkách infikovaných virem při MOI 25 ve srovnání s negativní kontrolou (KM) nebyl pozorován (obr. 23). Z obrázků 22 i 23 vyplývá, že vlivem slin dochází k inhibici aktivace signální dráhy NF-κB v porovnání s buňkami infikovanými samotným virem. Při MOI 25 je tento rozdíl statisticky signifikantnější ($p < 0,001$).



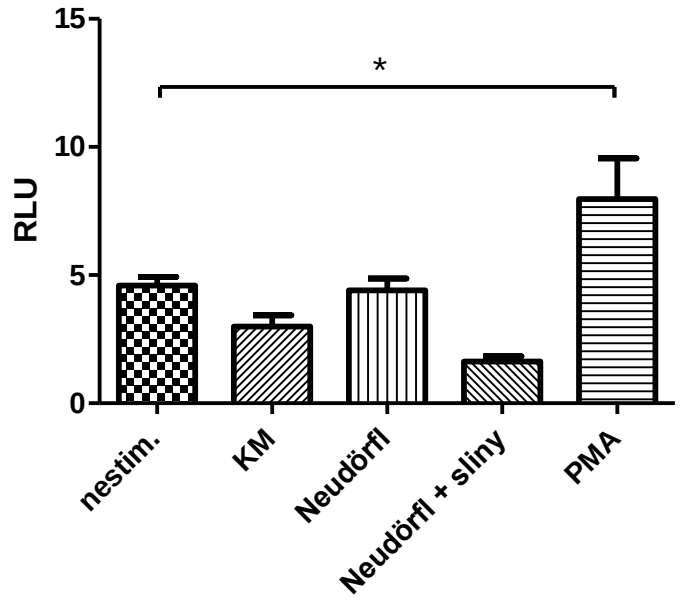
Obr. 22: Vliv klíštěcích slin na aktivaci signální dráhy NF-κB po stimulaci virem KE kmene Neudörfl, MOI 5



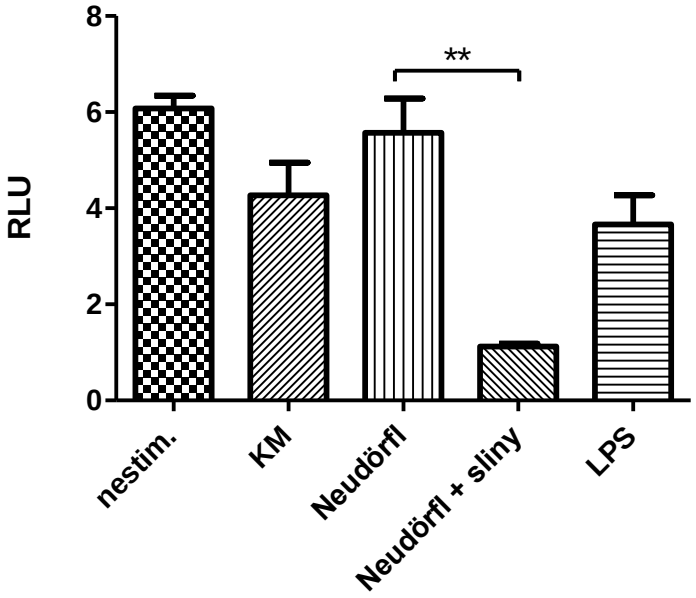
Obr. 23: Vliv klíštěcích slin na aktivaci signální dráhy NF-κB po stimulaci virem KE kmene Neudörfl, MOI 25

Obrázky 24 a 25 zobrazují výsledky aktivace signální dráhy MAPK/JNK. Buňky byly stimulovány virem KE kmene Neudörfl při MOI 5 a MOI 25 stejně jako v případě NF-κB. Jako pozitivní kontrola bylo použito PMA nebo LPS.

Buňky infikované virem nevykazovaly signifikantně zvýšenou aktivitu transkripčního faktoru AP-1 ve srovnání s negativní kontrolou. Po přidání slin došlo ke snížení aktivity AP-1, které bylo při MOI 25 signifikantní.



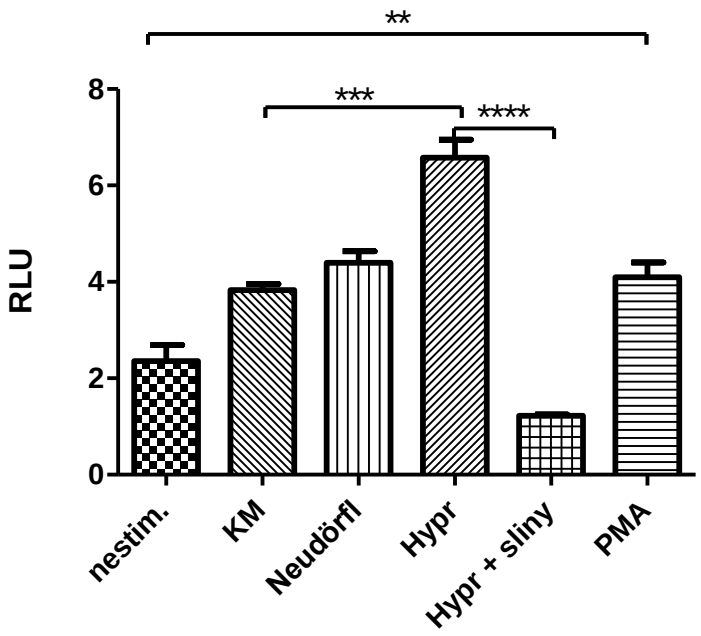
Obr. 24: Vliv klíštěcích slin na aktivaci signální dráhy MAPK/JNK po stimulaci virem KE kmene Neudörfl, MOI 5



Obr. 25: Vliv klíštěcích slin na aktivaci signální dráhy MAPK/JNK po stimulaci virem KE kmene Neudörfl, MOI 25

Obrázek 26 znázorňuje výsledky aktivace signální dráhy cAMP/PKA. Buňky byly na rozdíl od předešlých experimentů stimulovány virem KE kmene Neudörfl i Hypr. Jako negativní kontrola sloužilo kondiciované médium z Vero buněk a jako pozitivní kontrola PMA.

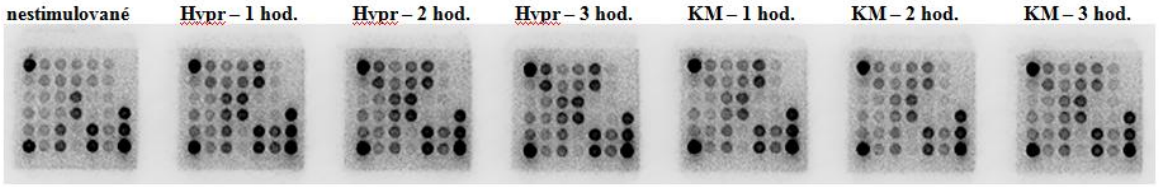
Z grafu (obr. 26) je patrné, že buňky infikované kmenem Hypr vykazovaly vyšší aktivitu transkripčního faktoru CREB oproti buňkám infikovaným kmenem Neudörfl. U buněk infikovaných kmenem Neudörfl byla aktivita CREB srovnatelná s negativní kontrolou. Vliv slin byl testován v buňkách infikovaných Hyprem. A opět byl pozorován inhibiční účinek na aktivaci cAMP/PKA signální dráhy.



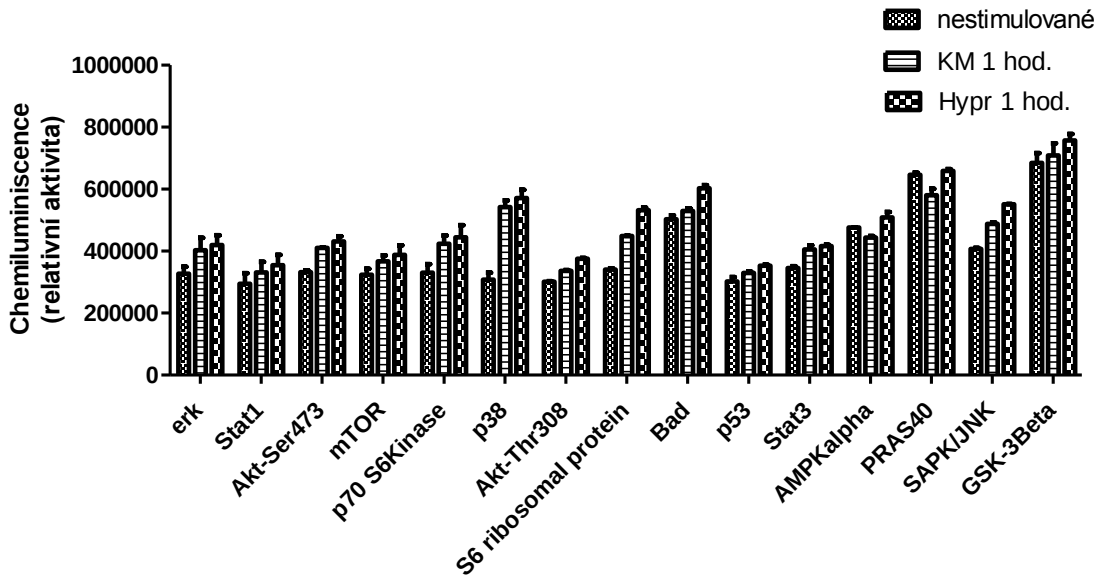
Obr. 26: Vliv klíštěcích slin na aktivaci signální dráhy cAMP/PKA po stimulaci virem KE kmene Neudörfl, MOI 5

3.5 Měření aktivace signálních drah pomocí kitu PathScan® Intracellular Signaling Array

Protože se metoda duální luciferázové reportérové eseje neukázala jako vhodná pro měření aktivace signálních drah, vyzkoušeli jsme metodu sendvičové imunoeseje s využitím kitu PathScan® Intracellular Signaling Array. Následující grafy (obr. 28, 29 a 30) zobrazují výsledky měření aktivity 15 signálních molekul v buňkách IC-21 1 až 3 hodiny po infekci kmenem Hypr (MOI 1). Nestimulované buňky a buňky s kondiciovaným médiem z Vero buněk sloužily jako negativní kontroly. Intenzita naměřeného chemiluminiscenčního signálu odpovídá aktivitě (fosforylaci) jednotlivých transkripčních faktorů. Aktivita jednotlivých signálních molekul je zobrazena na obrázku 27.

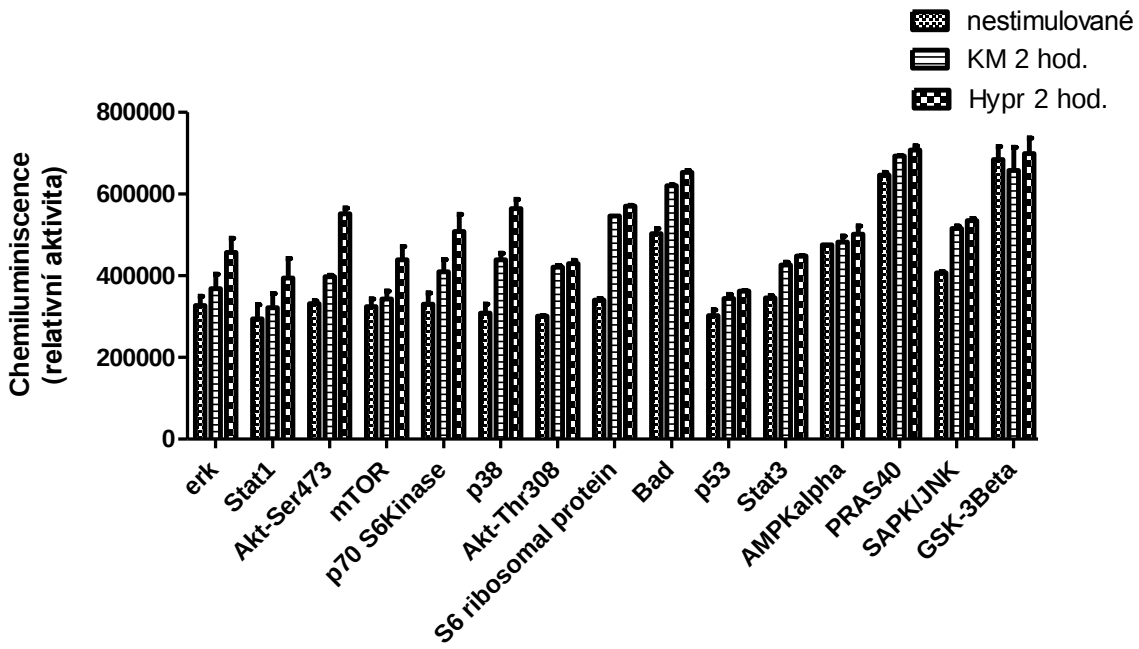


Obrázek 27: Aktivita jednotlivých signálních molekul



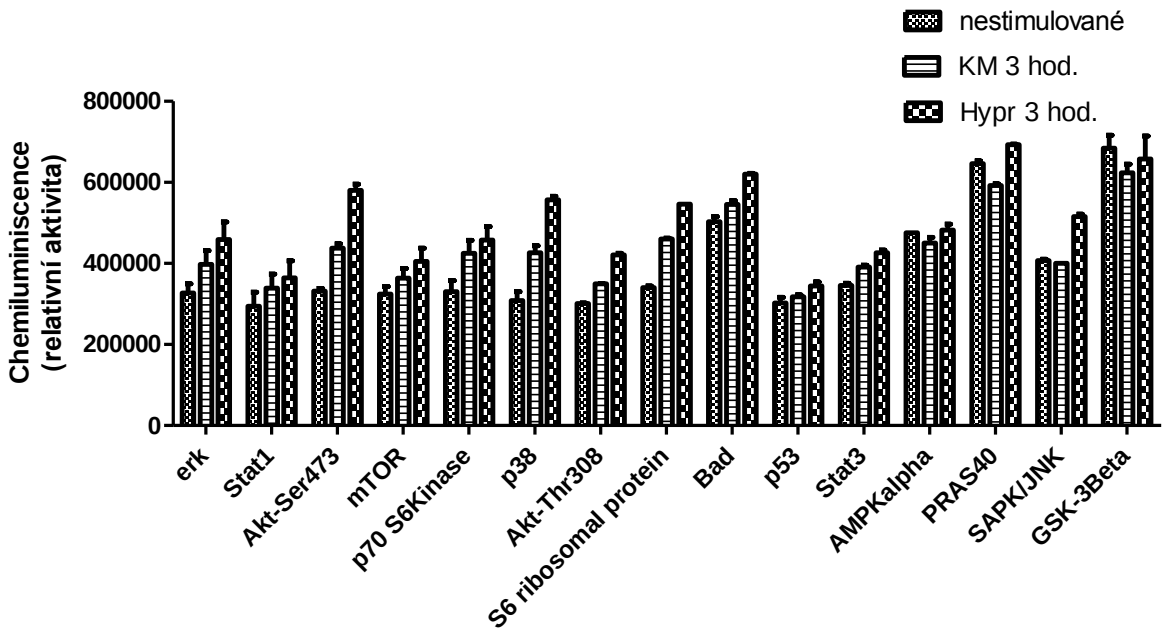
Obr. 28: Aktivita jednotlivých signálních molekul u buněk stimulovaných 1 hodinu Hyprem

V porovnání s kontrolním médiem došlo k statisticky signifikantní aktivaci u signálních molekul S6 Ribosomal Protein, Bad, AMPKα, PRAS 40, SAPK/JNK ($p < 0,0001$), dále u GSK-3β ($p < 0,01$) a Akt-Thr308 ($p < 0,05$).



Obr. 29: Aktivita jednotlivých signálních molekul u buněk stimulovaných 2 hodiny Hyprem

Po 2 hodinách inkubace buněk s Hyprem byl pozorován statisticky významný nárůst v aktivitě u signálních molekul Erk, Stat1, Akt-Ser473, mTOR, p70 S6 Kinase, p38 ($p < 0,0001$) a u molekuly GSK-3β ($p < 0,01$).



Obr. 30: Aktivita jednotlivých signálních molekul u buněk stimulovaných 3 hodiny Hyprem

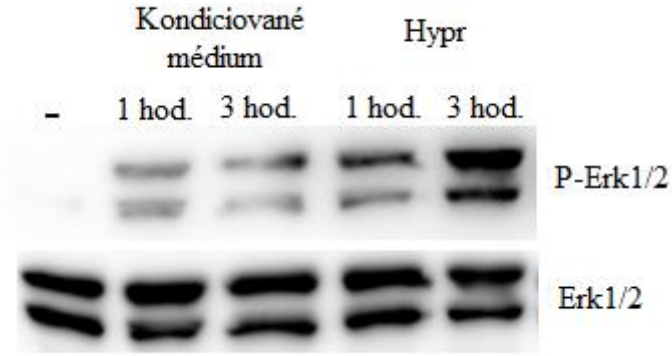
Po 3 hodinách byla naměřena statisticky signifikantní aktivita u Akt-Ser473, p38, Akt-Thr308, S6 Ribosomal Protein, Bad, PRAS 40, SAPK/JNK ($p < 0,0001$), dále Erk ($p < 0,001$) a mTOR ($p < 0,05$).

3.6 Měření aktivace signálních drah pomocí metody western blot

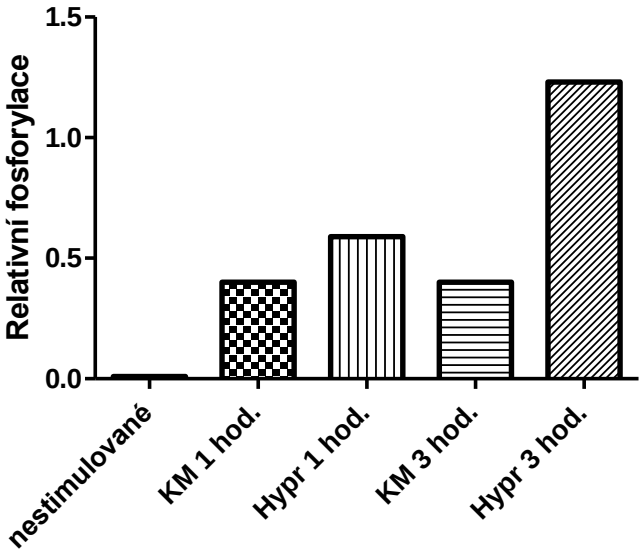
Vybrané výsledky ze sendvičové imunoeseje byly ověřeny pomocí western blotu.

Buňky IC-21 byly infikovány po dobu 1 a 3 hodin s Hyprem (MOI 1) a následně byl připraven proteinový lyzát. Ten byl použit na analýzu ve western blotu. Byly stanoveny jak fosforylované, tak celkové množství proteinů Erk1/2 či Akt pomocí specifických protilátek. Relativní aktivita testovaných kináz byla kvantifikována jako poměr fosforylované formy k celkovému proteinu a vyjádřena v grafech.

Jak je patrné z obrázku 31 a 32, fosforylace kinázy Erk1/2 v Hyprem infikovaných buňkách byla mírně zvýšena po 1 hodině a výrazně po 3 hodinách. Slabá aktivita Erk1/2 byla pozorována i po přidání kondiciovaného média.

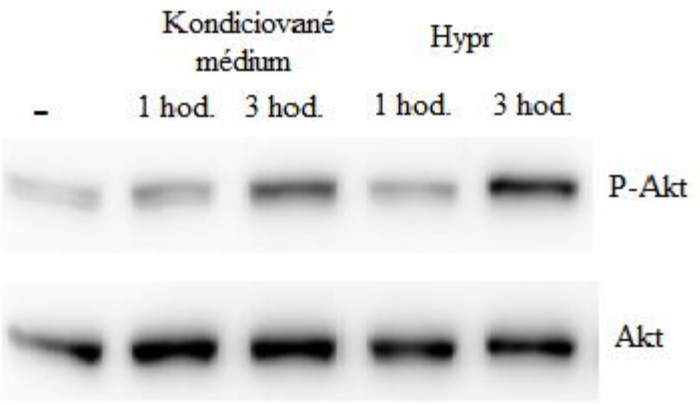


Obr. 31: Fosforylace signální molekuly Erk1/2 v buňkách IC-21 po infekci virem KE kmene Hypr

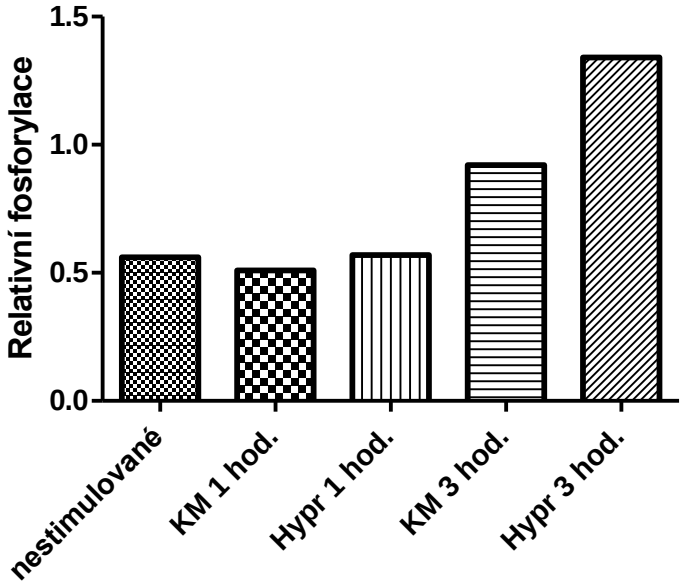


Obr. 32: Relativní fosforylace Erk1/2 v buňkách IC-21 po infekci Hyprem

Na obrázku 33 je znázorněn western blot zachycující fosforylaci Akt. Kvantitativní znázornění je zobrazeno na obrázku 34. Zvýšená fosforylace Akt byla vlivem Hypru pozorována až po 3 hodinách. Zároveň však došlo k nárůstu v kontrole (KM).



Obr. 33: Fosforylace signální molekuly Akt v buňkách IC-21 po infekci virem KE kmene Hypr



Obr. 34: Relativní fosforylace Akt v buňkách IC-21 po infekci virem KE kmene Hypr

4 Diskuze

Jedním z cílů mé práce bylo vybrat optimální metodu na měření aktivace signálních drah v makrofázích a dendritických buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy. Předpokládalo se, že vhodnou metodou by mohla být duální luciferázová reportérová esej. Mezi výhody této eseje patří rychlost provedení, oproti jiným používaným metodám (např. western blot), vysoká citlivost, dále větší přesnost díky renillové luciferáze (interní kontrola) a úspora materiálu.

Jelikož se tato metoda v laboratoři doposud nevyužívala, bylo ji nutné nejdříve optimalizovat. Pro měření aktivity signálních drah po infekci virem KE byly vybrány buňky makrofágové linie IC-21 a dendritické buňky. Tyto buňky jsou jedny z prvních, které se setkávají s patogenem a pomáhají viru rozšířit se v hostitelském organismu (Málková a Filip, 1968; Ahantarig a kol., 2009).

Při optimalizaci metody byly použity buňky IC-21 a plazmid, který umožňuje měřit aktivitu transkripčního faktoru NF-κB. Nejprve se zkoušely podmínky navrhnuté výrobcem. Pro různé typy buněk se i tyto podmínky mohou lišit. Proto byly testovány různé poměry reportérového a referenčního plazmidu, množství použité DNA i způsob transfekce. Na základě tohoto testování byly stanoveny vhodné podmínky pro metodu duální luciferázové reportérové eseje. Při poměru reportérového a referenčního plazmidu 10:1 došlo k výraznějšímu nárůstu luminiscence ve vzorcích stimulovaných LPS oproti nestimulovaným vzorkům, proto se v dalších experimentech využíval tento poměr. Dále bylo otestováno množství DNA použité na jeden vzorek. Použití 100 ng DNA, které bylo zároveň doporučováno výrobcem vykazovalo lepší výsledky než použití dvojnásobného množství. Třetím parametrem, který byl testován, byla metoda transfekce klasická versus reverzní. Obě metody vykazovaly podobné výsledky. Přesto jsme se rozhodli buňky transfekovat klasickou metodou, a to z důvodu vyšší konzistence získaných dat a nižších odchylek. Další výhodou byla možnost kontroly buněk před samotnou transfekcí, jako jsou životnost či jejich konfluence.

Jedním z cílů práce bylo využití metody duální luciferázové reportérové eseje na měření aktivity signálních drah po infekci virem KE i v dendritických buňkách.

Existuje několik způsobů transfekce, např. s využitím lipidů, virových konstruktů či elektroporace. Dle literatury se metoda transfekce pomocí lipidů jeví jako nejúčinnější i nejšetrnější pro primární dendritické buňky (Smith a kol., 2016). Zároveň od „virus-based“ transfekce, neinterferuje tato metoda s aktivací signálních drah indukovaných virem. V našich podmínkách se nám bohužel dendritické buňky i přes několik pokusů nepodařilo účinně transfekovat. Proto dendritické buňky nebyly dál používány a všechny další pokusy byly prováděny jenom na makrofágové linii IC-21.

Po stanovení vhodných podmínek transfekce se testovala funkčnost dalších plazmidů umožňujících měřit aktivitu transkripčních faktorů STAT-1/STAT-2, AP-1 a CREB. Pro sledování aktivace signální dráhy JAK/STAT, byly buňky stimulovány IQ a IFN-β. U buněk stimulovaných IFN-β došlo k signifikantnímu zvýšení luminiscenčního signálu. U buněk stimulovaných IQ naopak nebyla zaznamenána zvýšená luminiscence. Vysvětlením by mohla být nízká exprese TLR-7, jehož je IQ ligandem, a proto zřejmě nedošlo k produkci IFN-β a následné aktivaci signální molekuly STAT-1/STAT-2. I přesto, že jsme nenašli publikaci dokazující nízkou expresi TLR-7 v IC-21 buňkách, tuto teorii potvrdily i negativní výsledky ELISA testu, ve kterém byla testována přítomnost IFN-β v supernatantu IC-21 buněk stimulovaných IQ (data nejsou uvedena). Dále byla testována aktivace transkripčního faktoru AP-1. K aktivaci byl použit PMA po dobu 6 hodin dle doporučení výrobce. Bohužel nedošlo ke zvýšení aktivity AP-1. Tento výsledek si nedokážeme vysvětlit, protože jak koncentrace PMA, tak i doba aktivace buněk byla vhodně zvolena. Rovněž, jak je vidět u aktivace CREB, PMA byl schopen navodit aktivaci tohoto transkripčního faktoru. Nakonec byl testován plazmid aktivující transkripční faktor CREB. Buňky byly stimulovány s PMA a LPS. Jak již bylo zmíněno, na rozdíl od transkripčního faktoru AP-1, zde byla naměřena signifikantně zvýšená aktivita transkripčního faktoru CREB vlivem PMA.

Dále byla metoda duální luciferázové reportérové eseje použita pro měření aktivity signálních drah NF-κB a JAK/STAT po infekci virem KE. Infekce virem aktivovala signální dráhu NF-κB, ale ve srovnání s kondiciovaným médiem z Vero buněk, které

bylo použito jako negativní kontrola, nebyl zaznamenán prakticky žádný rozdíl. Jednou z příčin zvýšené aktivity NF-κB by mohla být kontaminace Vero buněk mycoplasmou. Tato možnost však byla vyloučena, proto se domníváme, že kondiciované médium z Vero buněk, použité jako kontrola, mohlo obsahovat buněčné komponenty schopné indukovat tento transkripční faktor.

Z výsledků testování signální dráhy JAK/STAT se ukázalo, že virus klíšťové encefalitidy nemá vliv na aktivaci transkripčního faktoru STAT-1/STAT-2, z čehož usuzujeme, že ve virem infikovaných buňkách IC-21 nedochází k produkci interferonu, která by postačovala k aktivaci STAT-1/STAT-2. Již naše předešlé zjištění ukázalo, že aktivace TLR-7 (který je klíčový pro rozpoznání viru KE) nevede k indukci interferonu. Virová RNA může být rozpoznávána i jinými receptory jako RLRs, které také mohou vést k produkci IFN-β (Thompson a kol., 2011). Protože nedošlo k aktivaci STAT-1/STAT-2 v buňkách IC-21, zdá se, že ani tyto receptory se v rozeznávání viru KE receptory neuplatňují.

Protože se duální luciferázový reportérový systém neukázal jako optimální na měření aktivity signalizačních molekul po virové infekci, vyzkoušeli jsme imunosendvičovou esej s kitem PathScan® Intracellular Signaling Array. V buňkách infikovaných virem Hypr došlo oproti buňkám s kondiciovaným médiem k statisticky signifikantnímu zvýšení aktivity několika signálních molekul. Po 3 hodinách bylo toto zvýšení pozorováno až u 9 signálních molekul – Erk, PRAS 40, Akt-Ser473/Thr308, mTOR, S6 Ribosomal Protein, p38, SAPK/JNK a Bad.

Nejvýrazněji byly ve virem infikovaných buňkách fosforylovány kinázy, které navazují na fosfatidyl-inositol-3 kinázu (PI3K). V této signální kaskádě je Akt přímo fosforylovaná s PI3K. Akt je serin/threoninová proteinkináza, která je aktivovaná v odpovědi na stimulaci různými faktory a má schopnost inhibovat apoptózu a podporovat přežívání infikovaných buněk (Kennedy a kol., 1997). Bad je členem Bcl-2 proteinové rodiny, který váže Bcl-2 nebo Bcl-X a inhibuje jejich antiapoptotické schopnosti. Pokud je ale Bad fosforylován na Ser136 skrze Akt/PKB nevykazuje proapoptotickou aktivitu v buňkách a je považován za jeden z cílů Akt/PKB na podporu přežívání buněk (Song a kol., 2005). Stresem aktivovaná proteinkináza (SAPK) reguluje

buněčnou odpověď na stres a cytokiny. SAPK systém se skládá ze dvou skupin kináz – JNK a p38 MAPK. SAPK signální dráha je důležitým cílem Akt/PKB regulace pro podporu přežívání buněk (Song a kol., 2005). Aktivace transkripčního faktoru NF-κB je závislá na fosforylaci IKK komplexů a degradaci IκB (inhibitor NF-κB). Akt/PKB reguluje aktivitu IκB kinázových komplexů (IKK). To vede k aktivaci NF-κB a transkripci NF-κB-závislých genů pro přežívání jako je Bcl-xL. Transkripční faktor CREB může být také fosforylován Akt/PKB na Ser133. Vede to k jeho zvýšené transkripční aktivitě. CREB také zprostředkovává Akt/PKB indukovanou expresi některých antiapoptotických genů, např. Bcl-2 (Song a kol., 2005). mTOR se podílí na regulaci několika buněčných funkcí v odpovědi na aminokyseliny a růstové faktory tím, že částečně reguluje fosforylaci p70 S6 kinázy, která vede k její aktivaci a progresi buněčného cyklu. S6 ribozomální protein se nachází downstream od p70 S6 kinázy a jeho fosforylace reflektuje aktivaci mTOR dráhy (Nojima a kol., 2003). Erk signální dráha chrání buňky před apoptózou a podporuje buněčnou proliferaci (Cargnello a Roux, 2011). Z výsledků této imunosendvičové eseje vyplývá, že virus KE aktivuje signální dráhy podporující navození antiapoptotického stavu buněk a tím podporuje jejich přežívání. Je to jeden z mechanismů, který virům umožňuje přežít a replikovat se v buňce.

Výsledky z imunosendvičové eseje byly dále ověřeny metodou western blotu, která se tradičně používá k detekci aktivace signálních molekul. Výsledky potvrdily, že virus KE kmene Hypr zřetelně zvyšuje fosforylaci kinázy Erk1/2 i Akt v makrofágové linii IC-21.

V poslední části práce jsme se zabývali vlivem klíštěcích slin na aktivaci transkripčních faktorů NF-κB, AP-1 a CREB vyvolanou virem KE. Virus KE kmene Neudörfl signifikantně zvýšil aktivitu NF-κB při MOI 5. I u jiných typů flavivirů (virus japonské encefalitidy, Dengue fever virus 2) dochází k aktivaci NF-κB dráhy, která je navíc závislá od aktivace PI3K/Akt dráhy (Chang a kol., 2005). Zcela nové je pozorování zvýšené aktivity transkripčního faktoru CREB po infekci virem KE kmene Hypr. Toto zvýšení nebylo prokázáno s kmenem Neudörfl, což se dá vysvětlit tím, že

mnohem virulentnější kmen Hypr způsobuje větší ER stres, který dle nejnovější studie vede k aktivaci CREB (Kikuchi a kol., 2016).

Co se týče efektu klíštěcích slin, několik pilotních experimentů ukázalo signifikantní snížení aktivace signální dráhy NF-κB při MOI 5 i MOI 25, signální dráhy MAPK/JNK při MOI 25 a signální dráhy cAMP/PKA při MOI 5. Vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah v makrofágové linii IC-21 nebyl doposud publikován. Je však známo, že klíštěcí sliny mají schopnost inhibovat produkci zánětlivých cytokinů a produkci oxidu dusnatého makrofágy (Gwakisa a kol., 2001). Exprese zánětlivých cytokinů je regulována těmito transkripčními faktory, a proto pokles jejich aktivity může být důvodem snížené produkce cytokinů. Vliv klíštěcích slin na signální dráhy byl ovšem testován u dendritických buněk, kde byl pozorován inhibiční účinek na fosforylaci NF-κB, Erk1/2 i Akt v dendritických buňkách stimulovaných boreliemi (Lieskovská a kol., 2012; Oliveira a kol., 2010). Kromě vlivu na produkci cytokinů mohou mít testované transkripční faktory vliv na virem navozenou apoptózu. Bylo publikováno, že NF-κB se podílí na indukci apoptózy vyvolané vlivem příbuzného viru KE, Dengue (Marianneau a kol., 1997). Oddálení apoptózy, indukované virem Hypr, bylo také pozorováno v přítomnosti slin v dendritických buňkách, ačkoli mechanismus není znám (Fialová a kol., 2010). Navíc CREB byl nedávno identifikován jako faktor pozitivně regulující expresi kritických signálních molekul UPR, konkrétně IRE1α a PERK, které vedou k apoptóze. Snížení aktivity obou transkripčních faktorů CREB i NF-κB klíštěcími slinami, by proto mohlo být zodpovědné za antiapoptotický stav (Smith a kol., 2016).

5 Souhrn

- V rámci optimalizace byly úspěšně nalezeny podmínky pro duální luciferázovou reportérovou esej v buňkách IC-21 s využitím různých aktivátorů.

- Duální luciferázová reportérová esej se ukázala jako nevhodná pro měření aktivace signálních drah v primárních dendritických buňkách.

- Aktivace signálních drah v buňkách IC-21 infikovaných virem KE byla testována metodou duální luciferázové reportérové eseje, sendvičové imunoeseje a western blotem.

    - Virus klíšťové encefalitidy kmene Hypr aktivoval fosfatidyl-inositolovou dráhu (Akt), Erk1/2 kinázu, CREB a několik dalších signálních molekul v buňkách IC-21.

    - Klíštěcí sliny měly negativní vliv na aktivaci transkripčních faktorů NF-κB, AP-1 i CREB v buňkách IC-21 po infekci virem KE.

6 Seznam použité literatury

Ahantarig, A., Růžek, D., Vancová, M., Janowitz, A., Šťastná, H., Tesařová, M., Grubhoffer, L. (2009): Tick-Borne Encephalitis Virus Infection of Cultured Mouse Macrophages. *Intervirology* 52: 283-290.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4): 783-801.

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

Arthur, J.S., Ley, S.C. (2013): Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13(9): 679-692.

Best, S.M., Morris, K.L., Shannon, J.G., Robertson, S.J., Mitzel, D.N., Park, G.S., Boer, E., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E. (2005): Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* 79(20): 12828-12839.

Bormane, A., Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R.., Salmina, K., et al. (2004): Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, Suppl 37: 36-47.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M. (2011): TLR-signaling Networks. *J. Dent. Res.* 90(4): 417-427.

Carey, M. (1998): The Enhanceosome and Transcriptional Synergy. *Cell* 92(1): 5-8.

Cargnello, M., Roux, P.P. (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75(1): 50-83.

Chang, T.H., Liao, C.L., Lin, Y.L. (2006): Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes Infect.* 8(1): 157-171.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Shevach, E.M., Strober, V. (1992): Current protocols in immunology. *National Institutions of Health*, Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Cooper, G.M. (2000): *The Cell. A Molecular Approach*. 2nd edition. Boston University: Sinauer Associates. ISBN-10: 0-87893-106-6.

Darnell, J.E., Jr, Kerr, I.M., Stark, G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 263(5164): 1415-1421.

Dobbs, M., Hughes, D., Narahari, J., Choi, J., Los, G., Webb, B., Matthew, E. (2013): Performing dual-spectral luciferrase assai using the BMG Labtech POLARstar Omega plate reader [online]. Dostupné z: www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/simultaneous-dual-emission-detection-luciferase-reporter-assays.html

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. *J. Gen. Virol.* 80(Pt 1): 179-185.

European Centre for Disease Prevention and Control (2012): Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. *ECDC* [online]. [cit. 2016-05-20]. Dostupné z: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TBE-in-EU-EFTA.pdf.

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.

Gelpi, E., Preusser, M., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F.X., Budka, H. (2005): Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(6): 506-512.

Grard, G., Moureau, G., Charel, R.N., Lemasson, J.J., Gonzales, 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.

Gritsun, T.S., Holmes, E.C., Gould, E.A. (1995): Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Res.* 35(3): 307-321.

Gritsun, T.S., Nutall, P.A., Gould, E.A. (2003): Tick-borne flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 61: 317-371.

Günther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Sköldenberg, B., Forsgren, M. (1996): Intrathecal production of neopterin and beta 2 microglobulin in tick-borne encephalitis (TBE) compared to meningoencephalitis of other etiology. *Scand. J. Infect. Dis.* 28(2): 131-188.

Günther, G. (1997): *Tick-borne encephalitis – on pathogenesis and prognosis*. Dissetation Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, 65 s.

Guven-Maiorov, E., Keskin, O., Gursoy, A., Van Waes, C., Chen, Z., Tsai, C.J., Nussinov, R. (2015): The Architecture of the TIR Domain Signalosome in the Toll-like Receptor-4 Signaling Pathway. *Sci. Rep.* 5: 13128.

Gwakisa, P., Yoshihara, K., Long To, T., Gotoh, H., Amano, F., Momotani, E. (2001): Salivary gland extract of Rhipicephalus appendiculatus ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Veterinary Parasitology* 99: 53-61.

Hatada, E.N., Krappmann, D., Scheidereit, C. (2000): NF-kappaB and the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 52-58.

Hayden, M.S., Ghosh, S. (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132(3): 344-362.

Hirano, M., Yoshii, K., Sakai, M., Hasebe, R., Ichii, O., Kariwa, H. (2014): Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 4): 849-861.

Horie, K., Umezawa, K. (2012): Inhibition of canonical NF-κB and suppression of inflammation and cancer growth by designed inhibitor DHMEQ. *Keio University, Japan*, [online]. [cit. 2016-07-10]. Dostupné z: http://eoncosurg.com/inhibition-of-canonical-nf-kb-and-uppression-of-inflammation-and-cancer-growth-by-designed-inhibitor-dhmeq.

Hořejší, V., Bartůňková, J. (2009): *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN: 978-80-7387-280-9.

Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J.H., Francischetti, I.M., Kotsyfakis, M. (2012): Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics* 75(13): 3842-3854.

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 Rev. Mol. Med.* 18: e1.

Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordán, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Hay, N. (1997): The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an antiapoptotic signal. *Genes & Dev*. 11: 701-713.

Kikuchi, D., Tanimoto, K., Nakavama, K. (2016): CREB is activated by ER stress and modulates the unfolded protein response by regulating the expression of IRE1α and PERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 469(2): 243-250.

Kindberg, E., Mickiené, A., Ax, C., Akerlind, B., Vene, S., Lindquist, L., Lundkvist, A., Svensson, L. (2008): A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J. Infect. Dis.* 197(2): 266-269.

Kříž, B., Gašpárek, M., Šebestová H. (2015): Situace ve výskytu klíšťové encefalitidy do roku 2014 v České republice. *SZÚ* [online]. [cit. 2016-05-21]. Dostupné z: http://www.szu.cz/tema/prevence/klistova-encefalitida.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011): Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* 30(1): 16-34.

Labuda, M., Austyn, J.M., Zuffová, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J., Nuttall, P.A. (1996): Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219(2): 357-366.

Lieskovská, J., Kopecký, J. (2012): Effect of tick saliva on signalling pathways activated by TLR-2 ligand and Borrelia afélii in dendritic cells. *Parasite Immunol*. 34(8-9): 421-429.

Liu, L., Wang, Y., Fan, Y., Li, Ch.-L., Chang, Z.-L. (2004): IFN-gamma activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in murine peritoneal macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 24(6): 334-342.

Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. (1999): An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223:77-92.

Mandl, C.W. (2005): Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.*111(2): 161-174.

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. *J. Gen. Virol.* 90: 1781-1794.

Málková, D., Filip, O. (1968): Histological picture in the place of inoculation and in lymph nodes of mice after subcutaneous infection with tick-borne encephalitis virus. *Acta. Virol.* 12(4): 355-360.

Marianneau, P., Cardona, A., Edelman, L., Deubel, V., Despres, P. (1997): Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol*. 71(4): 3244-3249.

Mauel, J., Defendi, V. (1971): Transformation of mouse peritoneal macrophages by SV40 virus. *Bacteriological Proceesings* 70, 180.

Mickiené, A., Pakalnienė, J., Nordgren, J., Carlsson, B., Hagbom, M., Svensson, L., Lindquist, L. (2014): Polymorphisms in Chemokine Receptor 5 and Toll-Like Receptor 3 Genes Are Risk Factors for Clinical Tick-Borne Encephalitis in the Lithuanian Population. *PLoS One* 9(9): e106798.

Miorin, L., Romero-Brey, I., Maiuri, P., Hoppe, S., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., Marcello, A. (2013): Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J. Virol.* 87(11): 6469-6481.

Mogensen, T.H., Paludan, S.R. (2001): Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 131-150.

Nojima, H., Tokunaga, Ch., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., Yonezawa, K. (2003): The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Partner, Raptor, Binds the mTOR Substrates p70 S6 Kinase and 4E-BP1 trough Their TOR Signaling (TOS) Motif. *J. Biol. Chem.* 278: 15461-15464.

Oliveira, C.J., Carvalho, W.A., Garcia, G.R., Gutierrez, F.R., de Miranda Santos, I.K., Silva, J.S., Ferreira B.R. (2010): Tick saliva induces regulátory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. *Vet. Parasitol*. 167(2-4): 288-297.

Palus, M., Bílý, T., Elsterová, J., Langhansová, H., Salát, J., Vancová, M., Růžek, D. (2014): Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 11): 2411-2426.

Perkins, N.D. (2006): Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25(51): 6717-6730.

Platanias, L.C. (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immun.* 5: 375-386.

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R. (2011): The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1813(9): 1619-1633.

Promega. ©2016: *Protocol of pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector* [online]. Dostupné z: http://worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/a/pgl4%2032%20luc2p%20nf-kb-re%20hygro%20vector%20protocol.pdf

Promega. ©2016: *pRL-TK Vector* [online]. Dostupné z: https://worldwide.promega.com/resources/vector-sequences/reporter-vectors/prl-renilla-luciferase-control-vectors/

Promega. (© 2003, 2009): Dual-Luciferase® Reporter Assay and Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay Systems [online]. Dostupné z: worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protcards/dual-luciferase%20reporter%20assay%20and%20dual-luciferase%20reporter%201000%20assay%20systems%20quick%20protocol.pdf

Rawlings, J.S., Rosler, K.M., Harrison, D.A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117(8): 1281-1283.

Růžek, D., Gritsun, T.S., Forrester, N.L., Gould, E.A., Kopecký, J., Golovchenko, M., Rudenko, N., Grubhoffer, L. (2008a): Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 374(2): 249-255.

Růžek, D., Bell-Sakyi, L., Kopecký, J., Grubhoffer, L. (2008b): Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Res.* 137(1): 142-146.

Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T.S., Gould, E.A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J., Grubhoffer, L. (2009a): CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384(1): 1-6.

Růžek, D., Vancová, M., Tesařová, M., Ahantarig, A., Kopecký, J., Grubhoffer, L. (2009b): Morfological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 7): 1649-1658.

Růžek, D., Salát, J., Singh, S.K., Kopecký, J. (2011): Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One* 6(5): e20472.

Růžek, D., Bilski, B., Günther, G. (2013): *Tick-borne encephalitis*. In: Singh, S. K., Růžek, D. (Ed.) *Neuroviral infections: RNA viruses and retroviruses*. CRC Press, Boca Raton 211-237.

Růžek, D. a kol. (2015): *Klíšťová encefalitida*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-5305-8.

Schindler, Ch., Levy, D.E., Decker, T. (2007): JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *J. Biol. Chem.* 282: 20059-20063.

Semenov, B.F., Khozinsky, V.V., Vargin, V.V. (1981): Immunopathology and immunotherapy of tick-borne encephalitis. In: Kunz, C. H. (Ed.) *Tick-borne encephalitis.* International Symposium Baden/Vienna 19.-30. October 1979. Fakultas-Verlag, Wien. 45-58.

Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry* 68: 821-861.

Shi, P.-Y. (2012): *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN: 978-1-904455-92-9.

Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., Kopecký, J. (2008): Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation and function while promoting development of Th2 responses. *J. Immun* 180: 6186-6192.

Smith, N., Vidalain, P.O., Nisole, S., Herbeuval, J.P. (2016): An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. *Sci. Rep*. 6:29891.

Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005): The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J. Cell. Mol. Med. 9(1): 59-71.

Sun, S.C. (2012): The noncanonical NF-κB pathway. *Immunol. Rev.* 246(1): 125-140.

Šenigl, F., Grubhoffer, L., Kopecký, J. (2006): Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology* 49(4): 239-248.

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., Taniguchi, T. (2005): Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243-249.

Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17(1): 1-14.

Ternovoi, V.A., Kurzhukov, G.P., Sokolov, Y.V., Ivanov, G.Y., Ivanisenko, V.A., Loktev, A.V., Ryder, R.W., Netesov, S.V., Loktev, V.B. (2003): Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 9(6): 743-746.

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.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76(9): 4350-4354.

Upadhyay, A.S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K.L., Dobler, G., Guo, J.T., Superti-Furga, G., Lill, R., Överby, A.K., Weber, F. (2014): Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell. Microbiol.* 16(6): 834-848.

Walker, W.S., Demus, A. (1975): Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro-established line of mouse peritoneal macrophages. *J. Immun.* 114: 765-769.