Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Přenos významných patogenů aktivovaný klíštěcími slinami

Bakalářská práce

Vedoucí práce

Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Autor

Helena Huspeková

České Budějovice 2011

Huspeková H., 2011: Přenos významných patogenů aktivovaný klíštěcími slinami. [The transmission of significant pathogens activated by tick saliva. Bc. Thesis in Czech.] - 48 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Ticks are one of the most common ectoparasites in the world and they are vectors of many tick-borne diseases. These diseases are caused by pathogens, including bacteria and viruses. The main point of the thesis is focused on enhancement of pathogens transmission, (especially *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the causative agent of Lyme disease) by tick saliva or salivary glands extracts, and I tried to refer the main molecules, which have immunomodulatory or inhibition effect on the immunity of host. This effect can lead to the enhancement of pathogens transmission and contributes to their extension in host.

The second part of the thesis is based on molecules, which can lead to the creation of vaccines against tick-borne diseases.

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

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

V Českých Budějovicích dne Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání tohoto velmi zajímavého tématu, za jeho velmi cenné rady, materiály a odborné vedení, které mi vždy ochotně poskytl.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za nekonečnou trpělivost a podporu při mém studiu a tímto se jim omluvit, že jsem během tvorby této bakalářské práce neměla mnoho času se jim dostatečně věnovat.

Obsah

1 Úvod ... 1
2 Lymeská borelióza ... 2
3 Klíšťata ... 4
3.1 Argasidae (klíšťákovití – měkká klíšťata) ... 4
3.2 Ixodidae (klíšťovití – tvrdá klíšťata), vektor *B. burgdorferi* ... 5
4 *Borrelia burgdorferi* sensu lato ... 7
4.1 Charakteristika spirochety *Borrelia burgdorferi* ... 7
4.2 Genom *Borrelia burgdorferi* ... 8
4.2.1 Plasmidy spirochety *Borrelia burgdorferi* ... 9
4.2.1.1 Příklady vybraných plasmidů ... 9
4.2.2 Povrchové proteiny spirochety *Borrelia burgdorferi* a jejich funkce ... 10
4.2.2.1 Vnější povrchový protein A (OspA – Outer Surface Protein A) ... 10
4.2.2.2 Vnější povrchový protein B (OspB) ... 11
4.2.2.3 Vnější povrchový protein C (OspC) ... 11
4.2.2.4 Erp proteiny (OspE/F – related proteins) ... 12
4.2.2.5 Decorin Binding Protein A, B; Fibronectin Binding Protein (BBK32) ... 13
5 Vzájemné interakce ... 15
5.1 Interakce klíštěte a hostitele ... 15
5.2 Interakce klíštěte a borelie ... 16
5.3 Interakce borelie a hostitele ... 17
6 Vlastnosti klíštěcích slin ... 19
6.1 Antikoagulační látky ... 19
6.2 Isac-like protein family ... 19
6.2.1 Isac (*Ixodes scapularis* anti-complement) ... 20
6.2.2 IRAC I, II (*Ixodes ricinus* anti-complement) ... 20
6.2.3 Salp20 ... 20
6.3 IL-2 binding protein ... 20
7 Slinami aktivovaný přenos (SAT – Saliva-acivated transmission) ... 21
7.1 Salp15 ... 23
7.2 Sialostatiny ... 25
7.3 B-cell inhibitory protein (BIP) ... 26
7.4 IL-2 binding protein ... 26

7.5 Histamine release factor (tHRF) 26
8 Vakcinace 28
8.1 OspA vakcíny 28
8.2 OspC vakcíny 29
8.3 DbpA vakcíny 29
8.4 Salp15 vakcíny 29
8.5 Vakcíny založené na skrytých antigenech 30
8.5.1 Vakcíny založené na proteinu ferritin 31
8.6 Duální vakcíny 31
8.6.1 Vakcíny založené na 64P 32
9 Diskuze 33
10 Závěr 37
11 Citovaná literatura 38

1 Úvod

Borrelia burgdorferi sensu lato je bakterie z čeledi Spirochetaceae způsobující Lymeskou boreliózu. Borelie byly v druhé polovině minulého století objeveny americkým mikrobiologem Willy Burgdorferem při zkoumání nemocí přenášených africkými klíšťaty (*Borrelia hermsii* – původce návratné horečky). Později Burgdorfer objevil v amerických klíšťatech podobnou bakterii způsobující Lymeskou boreliózu. Tato bakterie byla pojmenována po něm, tedy *Borrelia burgdorferi*. (Schnarr et al., 2006) Je velmi významným patogenem jak člověka, tak zvířat, a proto byla v poslední době podrobena bližšímu genetickému, molekulárnímu, ale i ekologickému zkoumání. Hlavním záměrem výzkumů bylo proniknout do molekulárních mechanismů patogeneze a interakcí borelií s přenašeči a definitivními hostiteli.

Primárně je *Borrelia burgdorferi* sensu lato přenášena klíšťaty ze skupiny *Ixodes*, i když v některých případech byla nalezena i ve střevě komárů (*Culex pipiens, Aedes vexans*) dokonce i v našich oblastech, což naznačuje, že přenos může být uskutečněn i jinými krev sajícími členovci. (Žákovská et al., 2006), (Halouzka et al., 1998) Tato skutečnost však nebyla zatím prokázána. (Bartůněk et al., 2006) Borelie si postupně vyvinuly schopnost jak přežít v mnoha různých prostředích, od členovců (klíšťata, komáři, blechy) až po vyšší teplokrevné obratlovce (savci, ptáci). Na přenosu z klíštěte do teplokrevného hostitele se nemalou měrou podílí i tzv. slinami aktivovaný přenos (saliva activated trasmission - SAT). Tato skutečnost je důkazem určité „spolupráce“ mezi borelií a klíštětem. SAT bude dále předmětem bakalářské práce.

Lymeská borelióza není problémem pouze pro člověka, komplikace způsobuje i u zvířat (zejména psi, kočky, koně, skot). Studie však prokázaly menší výskyt klinických projevů nemoci u lesní zvěře, což může být způsobeno dlouhodobou koevolucí borelií a jejich přirozených hostitelů. (Krupka et al., 2007)

2 Lymeská borelióza

Tato nemoc způsobovaná spirochetou *Borrelia burgdorferi* byla pojmenována podle města Old Lyme v Connecticutu v r. 1975. Objevilo se zde totiž 12 případů artritidy u vesnických dětí. V 25% případů byla pozorována charakteristická erythema migrans u lidí, u kterých se později vyvinula artritida. Od r. 1910 byla erythema migrans přičítána patogenu přenášenému klíšťaty, avšak až v r. 1982 Burgdorfer et al. izoloval *B. burgdorferi* z klíštěte z endemické oblasti. (Bartůněk et al., 2006)

Lymeská nemoc se dá rozdělit do tří fází – časné, akutní a chronické. V 70% případů začíná toto onemocnění objevením erythema migrans, což je červená okrouhlá skvrna s centrálním výbledem. Tato skvrna se objeví v místě, kde klíště proniklo pokožkou, cca po 7 – 14 dnech a je často doprovázena příznaky podobnými chřipce, jako jsou bolest hlavy, teplota, nachlazení, bolest svalů a klobů či malátnost. Po několika dnech až týdnech začne skvrna v závislosti na šíření spirochet migrovat, avšak i při neléčení antibiotiky skvrna po 4 až 12 týdnech zmizí. (Franz et al., 2003) Rozšiřování skvrny je známkou přechodu do druhé fáze infekce. (Bartůněk et al., 2006) U neléčených pacientů se vyvine artritida (3. fáze infekce) a zhruba v 15% případů se rozvine akutní neuroborelióza, a to po týdnech až měsících od počátku infekce. Nejčastějším neurologickým projevem je kraniální neuropatie, což je periferní obrna lícního nervu, objevující se zejména u dětí (může být i oboustraná). (Karkkonen et al., 2001) U dospělých se objevuje tzv. Bannwarthův syndrom, který se vyznačuje silnými bolestmi způsobenými zánětem míšních kořenů a mozkomíšních plen. Dalším objevujícím se postižením může být i kardiální forma boreliózy spojená s postižením dalších vnitřních orgánů, či postižením oka. (Bartůněk et al., 2006)

Následné studie léčených pacientů ukazují, že jejich celkový stav po léčbě je uspokojivý a srovnatelný s jedinci, kteří Lymeskou boreliózu neprodělali. Avšak u malé části pacientů se objevují symptomy, které přetrvávají měsíce až roky po léčbě. Tento tzv. post – Lyme syndrom (postboreliový syndrom) se vyznačuje vyčerpáním, bolestí svalů a dokonce i poruchami paměti. Tyto příznaky se objevují i po opakovaném přeléčení antibiotiky. Příčina tohoto syndromu je prozatím neznámá. (Schnarr et al., 2006)

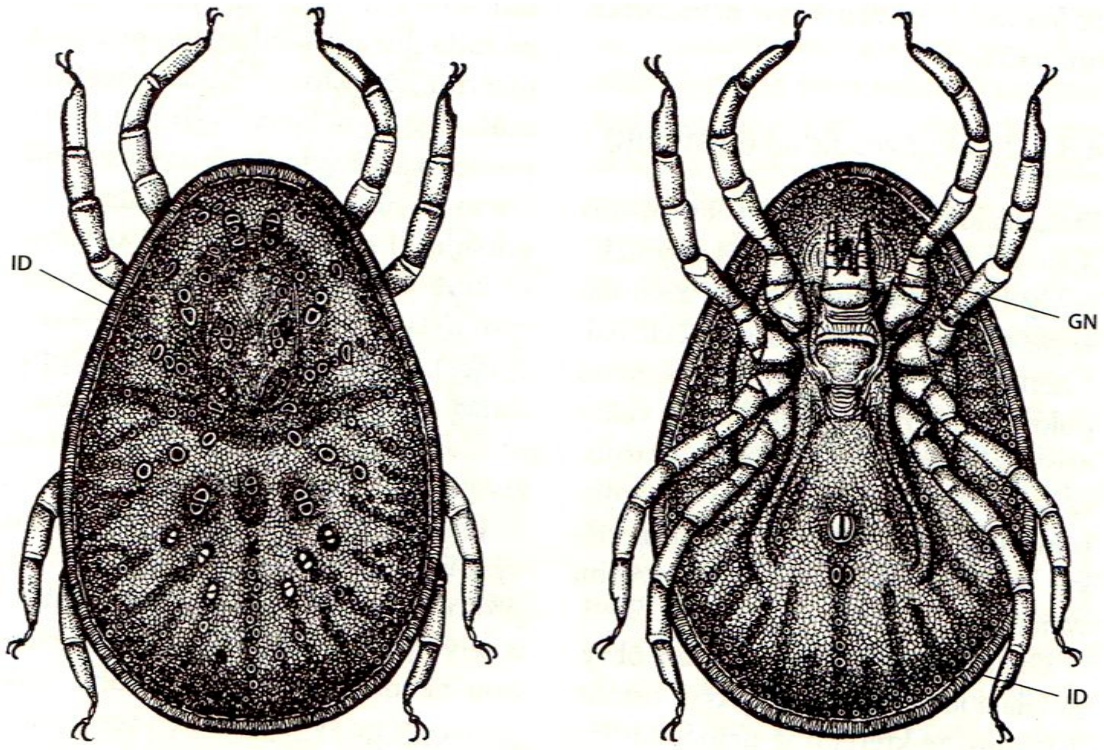
K léčbě Lymeské boreliózy se používají antibiotika, jejichž druh se liší v závislosti na stadiu infence a postiženém orgánu. Nejčastěji používanými typy jsou tetracykliny, peniciliny, makrolidy a cefalosporiny. Vhledem ke skutečnosti, že do dnešní doby neexistuje stoprocentní ochrana proti původci Lymeské boreliózy spirochetě *Borrelia burgdorferi,* je stále nejlepší a jedinou možností ochrany prevence. To zahrnuje omezení pohybu ve zvláště exponovaných oblastech a nošení vhodného oblečení s omezením nekrytých částí těla. Nezanedbatelné je samozřejmě i používání repelentů. (Bartůněk et al., 2006)

3 Klíšťata

Klíště patří mezi ektoparazitické členovce, svého hostitele ohrožuje jak přímým sáním krve, s ním spojenou ztrátou krve a poškozením kůže, tak i možností přenosu různých infekčních onemocnění. Podřád Metastigmata rozlišujeme na dvě čeledi, a to na čeleď Argasidae (klíšťákovití – měkká klíšťata) a čeleď Ixodidae (klíšťovití – tvrdá klíšťata). (Volf, Horák, 2007)

3.1 Argasidae (klíšťákovití – měkká klíšťata)

Tato čeleď klíšťat (Obr. 1) dostala svůj název „měkká“ díky jejich tělnímu pokryvu, který je na rozdíl od Ixodidae kožovitý či bradavičnatý. Od Ixodidae se liší jednak ghathosomou (část ústní nesoucí chelicery a makadla), která je při pohledu shora kryta pod idiosomou a dále především svým chováním. Klíšťáci totiž žijí často v hnízdech svých hostitelů, kde hostitele často, ale krátce napadají. Další odlišností je i počet larválních stadií, kterých je u klíšťáků mezi třemi až čtyřmi, a jejichž vývoj trvá zpravidla dva až tři roky. Nejběžnějším zástupcem u nás je *Argas reflexus* (klíšťák holubí), který může výjimečně sát i na lidech. Dalšími významnými druhy klíšťáků jsou *Argas persicus* (klíšťák zhoubný), který se vyskytuje nám nejblíže na Slovensku a v teplejších oblastech, sající zejména na domácí drůbeži, či *Ornithodoros moubata*, který je v Africe významným přenašečem *Borrelia duttoni*, což je původce návratné horečky. Jiní zástupci této čeledi přenášejí i další významné patogeny, jako například spirochety *Borrelia crocidurae* v Africe, *B. persica* v Asii a *B. parkerii* a *B. hermsii* (původci návratných horeček) v Americe. (Volf, Horák, 2007)



Obr. 1 Acarina, Ixodida, Argasidae, *Argas reflexus* (klíšťák holubí), dospělá samice (dorsální a ventrální pohled). GN – gnathosoma, ID – idiosoma. Převzato z: (Volf, Horák, 2007)

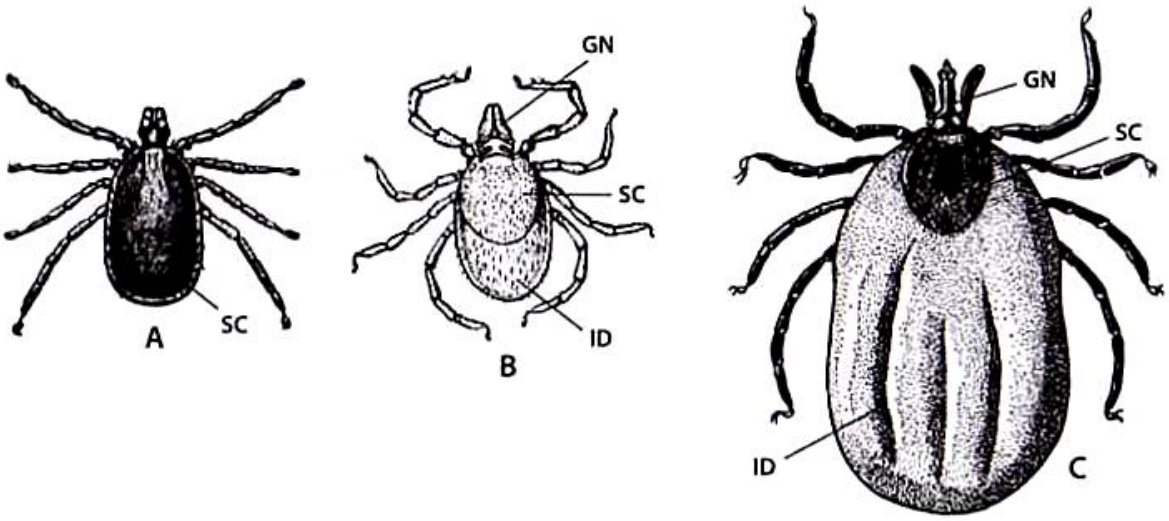
3.2 Ixodidae (klíšťovití – tvrdá klíšťata), vektor *B. burgdorferi*

Tato čeleď klíšťat (Obr. 2) má na hřbetní straně typický tvrdý štítek, který u samců kryje celé tělo, zatímco u samic pouze část těla. To umožňuje samicím nabýt několikanásobného objemu během sání hostitelské krve. Gnathosoma klíšťat je vybaveno ústním ústrojím, na kterém je velice nápadný hypostom se zahnutými zoubky. Ty umožňují klíštěti setrvat v potravní lézi. Některé druhy klíšťat si posilují ukotvení v hostiteli pomocí bílkovinné hmoty zvané cement. (Volf, Horák, 2007) Sání klíštěte trvá obvykle 4-8 dní, což je dost dlouhá doba na případný přenos patogenů do hostitele či samotného klíštěte, jelikož neinfikované klíště získá borelie právě pozřením krve nakaženého obratlovce. Klíště může získat potravu (krev) i z člověka, ačkoliv není jeho typickým hostitelem. Plně nasáté klíště poté odpadne a přemění se na vyšší instar (larva – nymfa – dospělec). Dospělé samice začnou produkovat vajíčka, což se děje pouze jedenkrát za jejich život. (Volf, Horák, 2007) U samic nakažených boreliemi jsou vajíčka zcela neinfekční, jelikož borelie nejsou transovariálně přenosné. (Hovius et al., 2007)

Vzhledem k tomu, že krev je jediným zdrojem potravy samic klíšťat, musel si tento druh vyvinout důmyslný způsob, jak se vypořádat s obrannými mechanismy hostitele. To zahrnuje vývoj určitých složek slin, obsahující antikoagulanty a protizánětlivé látky.

V našich oblastech se nejčastěji setkáváme s klíštětem obecným *Ixodes ricinus* (řád: Acarina, podřád: Metastigmata, čeleď: Ixodidae), který je velmi často i vektorem spirochety *Borrelia burgdorferi*. (Volf, Horák, 2007) Ve světě jsou takovými vektory i další druhy klíšťat, například *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* nacházející se v Severní Americe a již zmiňované *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* v Evropě a Asii. (Singh, Girschick, 2003)

Na našem území se běžně vyskytuje klíště obecné *Ixodes ricinus*. Tento druh má typický tříhostitelský cyklus, tj. že ke svému vývoji potřebuje tři různé hostitele (některé druhy jsou dvou- či jednohostitelské). Každé vývojové stadium potřebuje ke svému vývoji cca jeden rok, tzn., že celkový vývoj trvá zpravidla tři roky. Hostitele si vyhledávají pomocí Hallerova orgánu, který se nachází na tarzálních článcích prvního páru končetin. Tento orgán vnímá změny CO_2, tepla a chemických sloučenin ve vzduchu. V ČR se klíšťata vyskytují zejména ve smíšených a listnatých lesích s travnatým či křovinatým podrostem. Nejhojněji se vyskytují v období od března do listopadu, a to v závislosti na počasí. (Volf, Horák, 2007)



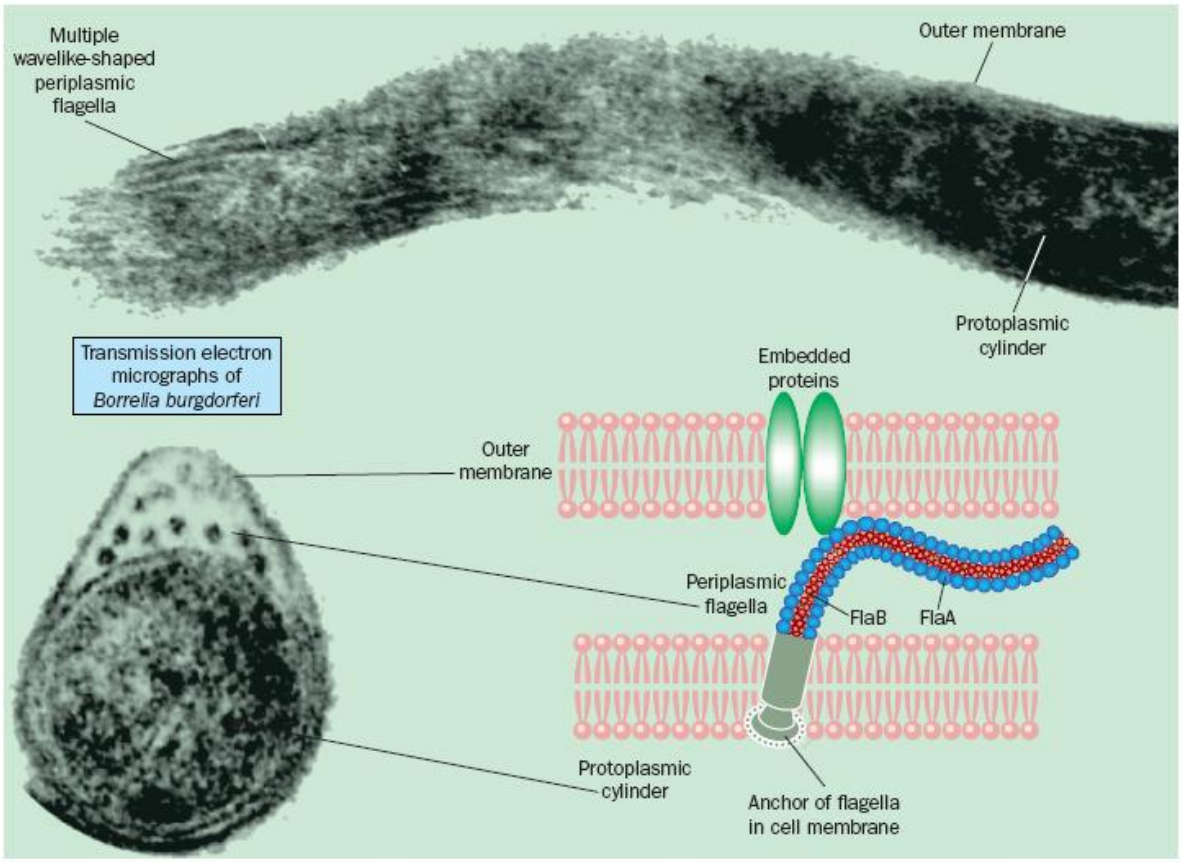
Obr. 2 Acarina, Ixodida, Ixodidae, *Ixodes ricinus* (klíště obecné).
A – dospělý samec, B – dospělá samice (nenasátá), C – dospělá samice (nasátá).
GN – gnathosoma, SC – scutum (štítek), ID – idiosoma. Převzato z: (Volf, Horák, 2007)

4 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Bakterie rodu *Borrelia* náleží do čeledi Spirochaetaceae zahrnující rody *Borrelia*, *Leptospira* a *Treponema*. *Borrelia burgdorferi* sensu lato je skupina spirochet zahrnující 12 druhů (toto číslo ale nejspíše není konečné), avšak jen tři druhy jsou reálnou hrozbou pro člověka. Těmito druhy jsou *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, která je rozšířena v Evropě a Severní Americe, a dále *B. afzelii* a *B. garinii* rozšířené hlavně v Evropě a Asii. (Nadelman, Wormser, 1998) Všechny tyto druhy jsou extracelulární patogeny schopné způsobit Lymeskou boreliózu, i když někdy s odlišnými klinickými projevy. (Balmelli, Piffaretti, 1995)

4.1 Charakteristika spirochety *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi sensu lato je svou strukturou typická spirocheta, tedy dlouhá, tenká, spirálovitě stočená gramnegativní bakterie. Vnější buněčná membrána obklopuje protoplasmatický cylindr, který je tvořen vnitřní buněčnou membránou a cytoplasmou. Mezi protoplasmatickým cylindrem a vnější membránou je ukotveno 7 až 14 periplasmatických bičíků, umožňujících borelii pohyb. Pohybuje se rotačním pohybem kolem podélné osy, případně smršťováním a natahováním. Bičíky se skládají ze dvou flagellinových proteinů, jmenovitě FlaA (38 kDa) a FlaB (41 kDa). (Ge et al., 1998) Borelie dosahují délky cca 20 – 30 μm a šířky od 0,2 do 0,5 μm. (Obr. 3) Jednotlivé bakterie a druhy se od sebe mohou některými aspekty lišit, například počtem závitů, který se pohybuje mezi 7 – 14, jejich vzdáleností, délkou a počtem bičíků. Jsou schopny přežívat v různých organismech a jejich rozmnožovací cyklus trvá cca 17 hodin. (Pal, Fikrig, 2003)



Obr. 3 Strukturální morfologie *B. burgdorferi*. Spirocheta se stává z protoplasmického cylindru, pokrytého buněčnou stěnou. V periplasmě jsou ukotveny bičíky, tvořené 2 proteiny, flagellinem A a B (FlaA, FlaB). Převzato z: (Singh, Girschick, 2004)

4.2 Genom *Borrelia burgdorferi*

Genom spirochety *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (kmen B31M1) je relativně malý. Je tvořený lineárním chromosomem a plasmidovou DNA. (Casjens et al., 2000) Celý genom obsahuje 1 521 419 bp, z toho plasmidovou DNA tvoří 610 649 bp a chromosomální 910 427 bp. Při osekvenování genomu borelie bylo zjištěno, že se skládá z jednoho chromosomu a 21 extra chromosomálních DNA elementů, tj. plasmidů. V současné době mají borelie největší počet plasmidů ze všech známých bakterií. (Fraser et al., 1997) Při porovnání s ostatními bakteriemi věnuje významnou část svého genomu (více jak 8% kódujících genů) kódování lipoproteinů. Tato vlastnost úzce souvisí s její schopností obsadit a kolonizovat velké množství organismů, jakými jsou teplokrevní obratlovci (savci, ptáci) a členovci (klíšťata, komáři). Dochází k tomu zejména díky změnám povrchových lipoproteinů. (Casjens et al., 2000)

Mnoho in vitro studií prokázalo, že genová exprese těchto spirochet je ovlivnitelná změnou vnějších podmínek, např. změnou pH, teploty a hostitelských faktorů. Při sání teplé hostitelské krve dochází postupně ke změnám podmínek ve střevě klíštěte. Hodnota pH se v tom okamžiku ve střevě změní ze 7,4 na 6,8 a teplota se změní z okolní (23 °C) na 37 °C. (Pal, Fikrig, 2003)

Genom *B. burgdorferi* je do jisté míry neobvyklý jak svou relativně malou velikostí, což souvisí s absencí genů zahrnutých v syntéze aminokyselin, mastných kyselin, enzymových kofaktorů a nukleotidů (Krupka et al., 2007), ale také tím, že více než 40% je uloženo v plasmidech, kterých je 12 lineárních (lp – linear plasmid) a 9 kruhových (cp – circular plasmid). (Fraser et al., 1997)

4.2.1 Plasmidy spirochety *Borrelia burgdorferi*

Jak již bylo řečeno, *Borrelia burgdorferi* má ve svém genomu obsaženo největší množství plasmidů ze všech doposud známých bakterií. Zdaleka ne všechny plasmidy jsou pro život této bakterie esenciální, některé z nich jí poskytují například selektivní výhody v různých prostředích, do kterých se během své existence dostane, jelikož proteiny související s patogenezí borelií jsou umístěny právě na plasmidech. (Barbour, 1988) Lineární plasmidy zde tvoří lp5, lp17, lp21, lp25, lp28-1, lp28-2, lp28-3, lp28-4, lp36, lp38, lp54 a lp 56 naopak kruhové cp9, cp26, cp32-1, cp32-4, cp32-6, cp32-7, cp32-8 a cp32-9. Na plasmidech se vyskytuje celkem 670 funkčních genů a 167 pseudogenů (segmenty DNA velmi podobné skutečným genům, ale netvoří funkční produkty), na chromosomu je 843 funkčních genů a jeden pseudogen. (Fraser et al., 1997) A právě pseudogeny se nashromáždily na plasmidech cp-9, lp56 a cp32-9 (Stewart et al., 2005), z dosavadních výzkumů lze předpokládat, že právě tyto plasmidy jsou v určité fázi „rozkladu“, genom borelie se tak zřejmě rozvíjí směrem ke zdravějšímu genomu, schopnému přizpůsobit se rozmanitým změnám různých prostředí. (Casjens et al., 2000)

4.2.1.1 Příklady vybraných plasmidů

lp54 kóduje geny regulované změnou teploty, které jsou rozhodující pro životní cyklus borelie v klíštěti i obratlovčím hostiteli, tedy například povrchové proteiny OspA (outer surface protein) nebo OspB, které jsou rozhodující pro připojení borelie ve střevě klíštěte. (Yang et al., 2004)

cp26 kóduje OspC, který je zásadní pro úspěšné rozšíření borelie. (Kumaran et al., 2001) O funkci těchto povrchových proteinů se budu ještě podrobněji zmiňovat.

4.2.2 Povrchové proteiny spirochety *Borrelia burgdorferi* a jejich funkce

Borrelia burgdorferi věnuje velmi významnou část svého genomu kódování lipoproteinů. Jaké proteiny a v jakém množství se budou produkovat, je do jisté míry ovlivnitelné změnou vnějších podmínek. Avšak většinou jde o multifaktoriální proces. Studie prokázaly schopnost této spirochety změnit lipoproteiny na svém povrchu, a to jak v různých fázích svého vývoje, tak i v různých vnitřních prostředích jak klíšťat, tak obratlovců. (Pal, Fikrig, 2003) Pomocí povrchových lipoproteinů interagují borelie s hostitelem, a to například tak, že se naváží ve střevě klíštěte či zmatou imunitní systém. (Pal et al., 2004)

Jedněmi z nejvíce prostudovaných lipoproteinů jsou bezpochyby OspA a OspC (dále i OspB, OspD, OspE, OspF).

4.2.2.1 Vnější povrchový protein A (OspA – Outer Surface Protein A)

OspA, jehož molekulová hmotnost je 31 kDa, je kódován plasmidem lp54 společně s genem pro další povrchový lipoprotein OspB. OspA se ve velkém množství prvně objeví na povrchu borelie při obsazení klíštěcího střeva. (Schwan, Piesman, 2000) Během setrvávání ve střevě produkují borelie velké množství OspA až do chvíle, kdy klíště najde svého hostitele a začne sát krev. (Pal et al., 2000) Studie prokázaly, že OspA je nezbytný pro úspěšné obsazení a kolonizaci klíštěcího střeva. Ovšem, během sání a přísunu krve dojde k zásadní změně. Produkce OspA se rapidně sníží a naopak produkce OspC se zvýší. (Pal et al., 2004) Jednou z hlavních funkcí OspA je vázání na glykoprotein TROSPA (tick receptor for OspA), který je v epitelu střeva klíštěte. Biologická funkce TROSPA je prozatím neznámá, avšak bylo zjištěno, že jeho množství roste u klíšťat nakažených boreliemi. Další z funkcí OspA je aktivace imunitního systému hostitele navázáním se na Toll-like receptory 1 a 2. Tato vlastnost může být také důvodem, proč se OspA neexprimuje při přechodu borelií do koncového hostitele (obratlovce). Díky tomu se zabrání aktivaci imunitního systému a zahájení zánětlivé reakce v rané fázi infekce. (Krupka et al., 2007) Avšak bylo zjištěno, že v pozdější fázi infekce je produkce OspA borelií zvýšena v zánětlivém prostředí, a proto není zatím jasné, zda produkce OspA je podstatná pro rozvoj

chronické infekce nebo zda je to pouze reakce borelií na imunitní reakci hostitele. Tuto teorii podporuje fakt, že OspA je schopen borelie ochránit před agresivním prostředím hostitele s nízkým pH nebo proteázami (střevo klíštěte, zanícená tkáň obratlovce). (Crowley, Hubert, 2003)

4.2.2.2 Vnější povrchový protein B (OspB)

U OspB, jehož molekulová hmotnost je 34 kDa a jenž je kódován na plasmidu lp54, se předpokládá, že se podobně jako OspA váže na střevní epitel, ale odlišným způsobem nesouvisejícím s TROSPA. (Fikrig, Narasimham, 2006)

4.2.2.3 Vnější povrchový protein C (OspC)

OspC (23 kDa) je protein kódovaný plasmidem cp26. Krystalová struktura OspC kmene B31 v roce 2001 odhalila, že monomer OspC je složený ze čtyř dlouhých a jednoho krátkého α-helixu a že je velice polymorfní. Kumaran et. al. v r. 2001 svou studií odhalil, že OspC dimerizuje a vytváří útvary tvarem podobné ledvině. Předpokládá, že tento protein může biologicky fungovat jako dimer. (Kumaran et al., 2001) Funkce OspC byla dlouho neznámá, ovšem až do doby, kdy byl popsán jeho ligand Salp15 (složka klíštěcích slin se schopností potlačit rozvoj imunitní odpovědi obratlovčího hostitele během sání klíštěte). OspC se na povrchu borelií začne produkovat ve chvíli, kdy klíště začne sát krev a borelie následně migrují do jeho slinných žláz. (Garg et al., 2006)

Exprese tohoto povrchového lipoproteinu je ale multifaktoriální proces, tedy pouhá změna teploty nejspíše nestačí. Sérií pokusů bylo zjištěno, že borelie v nenakrmeném klíštěti, které je vystaveno vyšším teplotám, nezačnou produkovat OspC. Transkripce OspC je totiž navíc kromě teploty regulována alternativním sigma faktorem (RpoS). (Hübner et al., 2001) Množství RpoS je regulováno malou nekódující sekvencí RNA (DsrABb), která je ovlivňována právě změnou teploty. Kmen *Borrelia burgdorferi*, jenž postrádal DsrABb, nemohl regulovat RpoS a v závisloti na tom ani OspC. U tohoto kmene byla tedy hladina OspC regulována pouze hodnotou pH a denzitou buněk. (Lybecker, Samuels, 2007)

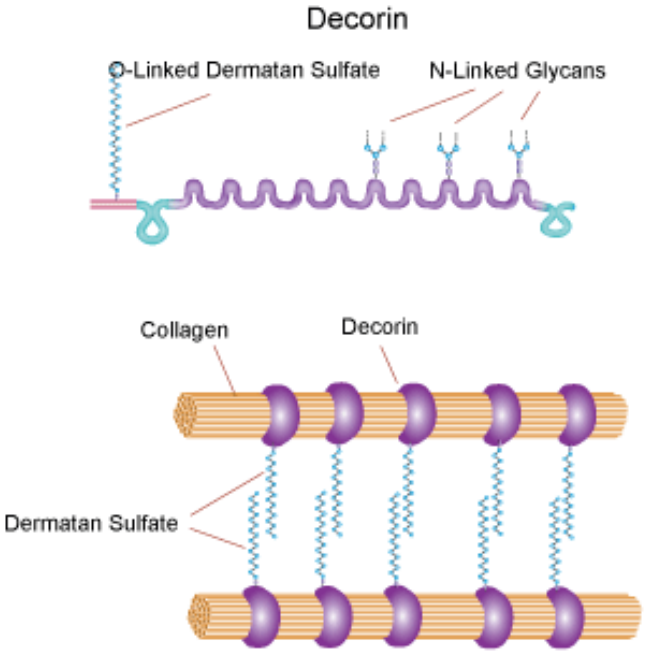
4.2.2.4 Erp proteiny (OspE/F – related proteins)

Erp proteiny jsou boreliemi syntetizovány během rané fáze savčí infekce. Erp genová rodina je kódována jak na kruhových, tak na lineárních plasmidech, konkrétně na cp32 (geny OspF, erpAB, erpCD, erpG, erpHY, erpIJ, erpK, erpLM, erpNO, erpPQ, erpX) a pouze jeden na lp56 (erpX). (Stevenson et al., 1998) Exprese těchto proteinů je snížena v klíštěti, ale následně zvýšena v časné fázi infekce obratlovce. Studie prokázaly, že Erp umožňují boreliím infikovat savce právě díky schopnosti blokovat alternativní cestu komplementu, což je jeden z hlavních způsobů savčí obrany proti patogenům. (Hellwage et al., 2001) Alternativní cesta komplementu totiž reaguje například na přítomnost cizorodých povrchových složek, např. složek buněčné stěny bakterií (g+ i g-). Spirochety jsou schopny produkovat různé Erp na svém povrchu a každý Erp má afinitu k jiné složce komplementu u odlišných obratlovčích hostitelů. Toto je také jeden z důvodů, proč jsou borelie schopny přežít v tak rozmanitých hostitelích. (El-Hage, Stevenson, 2002)

Samotný mechanismus blokování komplementu spočívá ve schopnosti borelií vázat dva hostitelské regulační proteiny komplementu, kterými jsou faktor H a faktor H-like protein 1/reconectin (FHL-1/reconectin). (Hellwage et al., 2001) Faktor H (vázaný pomocí OspE) se totiž obvykle váže na receptory na povrchu hostitelských buněk, potlačí rozklad C3 složky komplementu na C3a a C3b, a ochrání tak buňku před degradací právě C3b složkou. (Kurtenbach et al., 2002) U savců je to jeden ze způsobů, jak zabránit vzniku autoimunitní reakce, což borelie úspěšně využívají ve svůj vlastní prospěch. (Hellwage et al., 2001)

4.2.2.5 Decorin Binding Protein A, B; Fibronectin Binding Protein (BBK32)

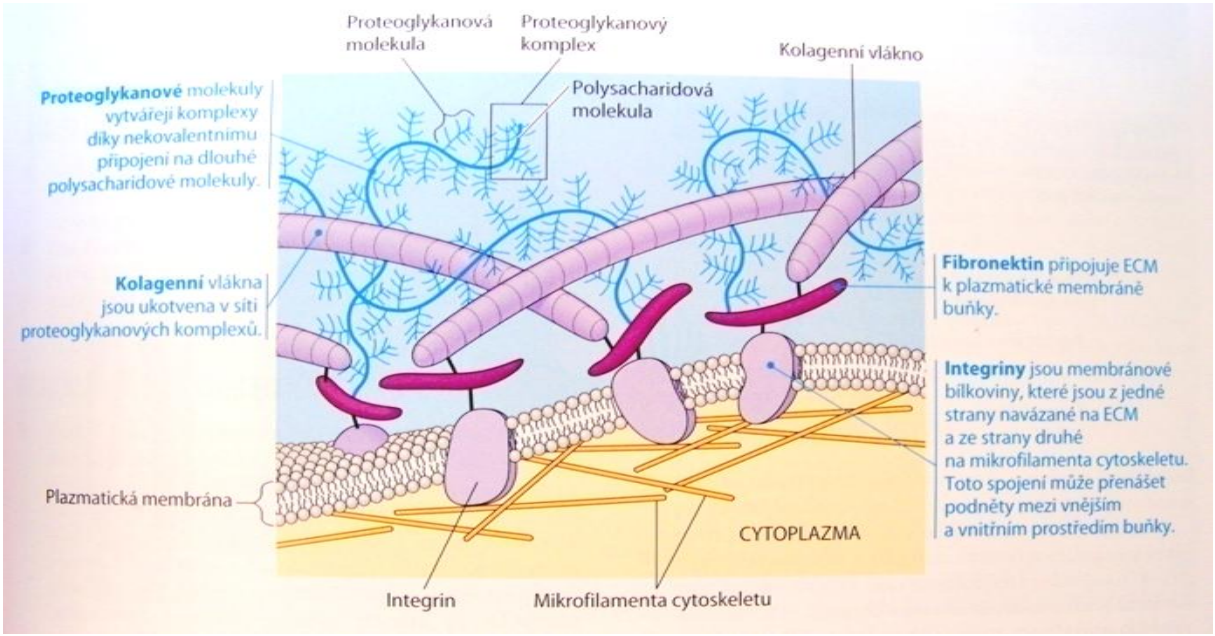
Neméně podstatnými povrchovými proteiny borelií jsou tzv. Decorin Binding Proteins A a B (DbpA, DbpB). Jejich molekulová hmotnost je 20 kDa (DbpA) a 22 kDa (DbpB). Jednou z hlavních vlastností těchto proteinů je schopnost vázat dekorin (Obr. 4), což je proteoglykan vyskytující se na povrchu kolagenních vláken. (Feng et al., 1998), (Hagman et al., 2000)



Obr. 4 Schéma dekorinu vyskytujícího se na kolagenních vláknech.
Převzato z, k dispozici on-line: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/decorin.htm

Tyto proteiny usnadní připojení *B. burgdorferi* k proteinům extracelulární matrix v okamžiku, kdy kolonizuje savčí tkáně. (Ulbrandt et al., 2001) Studiemi bylo prokázáno, že borelie se nebyly schopné rozšířit v dekorin deficientních myších, což naznačuje, že v jejich rozšíření hraje právě vazba na dekorin velmi podstatnou roli. (Brown et al., 2001)

Mezi proteiny vyskytující se na povrchu *B. burgdorferi* můžeme také zařadit tzv. Fibronectin Binding Protein (BBK32), jehož molekulová hmotnost je 47 kDa. Tento adhezin umožňuje borreliím vázat se na fibronektin (Obr.5), který se také řadí mezi extracelulární proteiny. (Probert et al., 2001)



Obr. 5 Znázornění fibronektinu a jeho biologické funkce. Převzato z: (Campbell, Reece, 2008)

Všechny tyto proteiny (zejména DbpA a BBK32) jsou syntetizovány v časné fázi infekce, kdy napomáhají boreliím přilnout k proteinům exracelulární matrix. Tím umožní přežití i velmi malému počtu spirochet, které se do hostitele dostaly z klíštěcích slin. Zde mají borelie možnost namnožit se a již v hojném počtu invadovat okolní tkáně. Možnost připojit se k proteinům v těle hostitele tak rozšířeným, usnadňuje borreliím nastolení chronické infekce. (Pal, Fikrig, 2003)

5 Vzájemné interakce

Pro klíště je obratlovčí hostitel (zejména savec) nezbytným zdrojem potravy, díky kterému se může úspěšně vyvíjet a množit. Stejně tak klíště je pro spirochety *Borrelia burgdorferi* podstatným vektorem, sloužícím k přenosu do koncového hostitele, v němž se následně borelie šíří a způsobují mnoho zdravotních komplikací.

5.1 Interakce klíštěte a hostitele

Během sání na hostiteli, které může trvat od minut až po hodiny u měkkých klíšťat (Argasidae), či dokonce dny u tvrdých klíšťat (Ixodidae), (Francischetti et al., 2009) vpravuje klíště do rány své sliny, které obsahují velké množství fyziologicky aktivních molekul. Tyto látky jsou přínosné jak pro klíšťata, tak i pro případný patogen, který přenášejí. (Ramamoorth et al., 2005) Aktivace imunitního systému a styk s krví hostitele začíná již ve chvíli, kdy klíště pronikne kůží. První molekuly imunitního systému, které se dostanou do styku s klíštěcími slinami, jsou žírné buňky, eosinofily, dendritické buňky a makrofágy. Tyto buňky začnou produkovat chemotaktické faktory, které do místa sání klíštěte přivedou buňky účastnící se akutní fáze zánětu, jakými jsou např. neutrofily. Další napadení může u hostitele vyvolat produkci T a B buněk, které začnou produkovat specifické protilátky a aktivovat žírné buňky a basofily, které jsou společně s eosinofily převládajícími buňkami v místě proniknutí klíštěte. (Francischetti et al., 2009)

Antigeny obsažené v klíštěcích slinách jsou rozpoznány v epidermis Langerhansovými buňkami (nezralé dendritické buňky, nacházející se v bazální vrstvě epidermis), (Krejsek, Kopecký, 2004) které je dopraví do lymfatických uzlin, kde je prezentují T lymfocytům. (Nithiuthai, Allen, 1985) T lymfocyty se diferencují na Th lymfocyty (CD4+, pomocné) a Tc lymfocyty (CD8+, cytotoxické). Th lymfocyty se dále diferencují na Th1 a Th2 subpopulaci, podle cytokinů, které produkují. Th1 lymfocyty produkující IL-2, IFNγ a TNFβ (=lymfotoxin) a Th2 subpopulace tvoří IL-4, IL-5, IL-6 a G-CSF. (Krejsek, Kopecký, 2004) Do místa sání migrují granulocyty, konkrétně basofily a eosinofily. Množství eosinofilů je za normálních okolností v těle nízké, zvyšuje se až v okamžiku výskytu parazitické infekce. (Francischetti et al., 2009) Basofily dopraví do místa sání histamin, který nejen rozšiřuje a zvyšuje propustnost kapilár, ale podle studie provedené Paine et al. inhibuje slinění a sání klíštěte. (Paine et al., 1983) Histamin spouští kaskádu zánětlivé a imunitní odpovědi, což vyústí v objevení otoku a následném svědění.

Dále zvyšuje produkci TNFα, který potlačuje infekci způsobenou *B. burgdorferi* a aktivuje NK buňky, jež mají i antivirovou funkci. (Takeshita et al., 2003) Následkem přílivu basofilů vznikne v místě vniknutí klíštěte kožní basofilní hypersenzitivita, zprostředkovaná Th1 subpopulací lymfocytů. Jedná se zde o typ oddálené přecitlivělosti. (Mosmann, Coffman., 1989)

5.2 Interakce klíštěte a borelií

Borrelia burgdorferi je celosvětově nejznámějším klíštětem přenášeným patogenem, což zapříčinilo její velice podrobné zkoumání. Úspěšnost přežívání těchto spirochet závisí na jejich schopnosti kolonizovat a interagovat s různými tkáněmi hostitelů. (Singh, Girschick, 2004) Klíčovou úlohu zde hraje množství povrchových proteinů a jejich exprese lišící se v závislosti na prostředí, ve kterém se borelie zrovna nacházejí, a na změně vnějších podmínek.

Ve chvíli, kdy začne klíště sát na infikovaném hostiteli, borelie se dostanou spolu s hostitelskou krví do střeva klíštěte. V tomto okamžiku začnou borelie produkovat na svém povrchu povrchový protein OspA, (Schwan et al., 1995) díky kterému jsou schopny navázat se na povrch klíštěcího střeva, konkrétně na protein TROSPA (tick receptor for OspA). Tato vazba jim umožní vyhnout se obranným mechanismům klíštěte a setrvat zde až do dalšího klíštěcího sání. (Pal et al., 2004) Podobnou roli jako OspA hraje ve vazbě na střevo klíštěte i OspB. Neelakanta et al. ve své studii z r. 2007 poukazuje na fakt, že OspB deficientní *B. burgdorferi* sice byly schopné migrace do klíštěcího střeva, avšak měly zde zhoršenou schopnost adheze ke střevu, s čímž souvisí i menší úspěšnost přežití. (Neelakanta et al., 2007)

Když začne klíště sát na dalším hostiteli, množství borelií ve střevě se rapidně zvýší a nastane jejich migrace skrz hemolymfu do slinných žláz. (Spielman et al., 1987) Tento přesun je doprovázen změnou exprese povrchových proteinů. Exprese OspA a OspB je snížena, stejně tak jako TROSPA ve střevě klíštěte, a začne se ve větší míře exprimovat OspC, (Pal et al., 2004) spolu s dalšími proteiny, jakými jsou DbpA, DbpB a BBK32. (Hodzic et al., 2002), (Fikrig et al., 2000) OspC jednak umožní úspěšný přesun borelií ze střeva do slinných žláz a jednak je klíčovým faktorem pro nastolení úspěšné infekce v hostiteli. Pal et. al. ve své studii předkládá fakt, že OspC deficientní *B. burgdorferi* nebyly

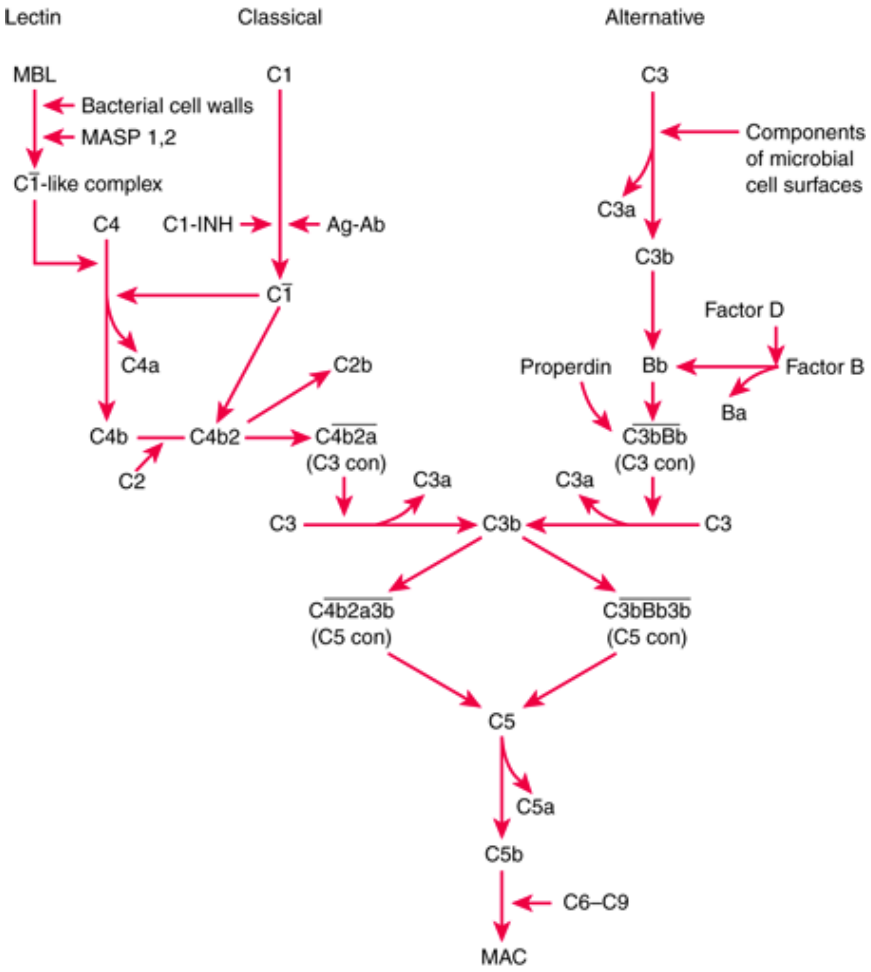
schopné migrace do slinných žláz klíštěte a navíc byly velice málo úspěšné v přenosu do myšího hostitele a nastolení infekce. (Pal et al., 2004)

5.3 Interakce borelií a hostitele

Prakticky první překážkou, které musí tyto spirochety při vniknutí do obratlovčího hostitele čelit, je alternativní cesta komplementu (Obr. 6), tedy forma vrozené imunity. Alternativní cesta komplementu je aktivována stykem s cizími povrchovými složkami, jako jsou např. složky buněčné stěny bakterií, a je tvořena čtyřmi sérovými proteiny C3, faktor B, faktor D a properdin. C3 složka komplementu hydrolyzuje na C3a a C3b. C3b se následně váže na povrchové antigeny na povrchu bakterie, kde slouží jako významný opsonin (díky opsonizaci je patogen rozpoznán fagocyty), a naváže faktor B, který zde funguje jako substrát pro faktor D. Faktor D rozštěpí faktor B za vzniku komplexu C3bBb. Vzniklý komplex je stabilizován properdinem a působí jako alternativní C3 konvertáza. Vzniklé fragmenty C3a mají výrazný chemotaktický účinek na fagocyty. Z části molekul C3 konvertázy vznikají složitější komplexy (štěpící C5 na C5a a C5b) sloužící jako C5 konvertáza. Fragmenty C5b dále tvoří komplexy s dalšími složkami komplemetu (C6, C7 a C8), což vede ke vzniku komplexu, který perforuje membránu bakterie (membrane attack complex – MAC) a způsobí její lýzu. (Hořejší, Bartůňková, 2009) *B. burgdorferi* mají však prostředky, jak bojovat proti komplemetu. Klíčovou úlohu zde hrají povrchové proteiny borelií a to zejména OspE/F a CRASPs (complement-regulator acquiring surface proteins). Borelie jsou totiž schopny vázat dva hostitelské kontrolní proteiny komplementu – faktor H a faktor H-like protein 1/reconectin. CRASPs byly dle studie Kraiczy et al. z r. 2001 rozděleny na CRASP-1 (27,5 kDa), který váže zejména faktor H-like protein 1/reconectin, a CRASP-2 (20-21 kDa), který váže především faktor H. OspE také váže faktor H, jenž se vyskytuje na povrchu hostitelských buněk a chrání je tak před degradací C3b složkou komplementu. (Kraiczy et al., 2001) Díky navázání faktoru H jsou borelie skryty před komplementem a následnou degradací. (Kurtenbach et al., 2002)

Na povrchu buněk zahrnutých v prvotní odpovědi na infekci (fagocyty, dendritické buňky, neutrofily) se nacházejí receptory, často označované jako PRR (pathogen recognition receptors), které jsou schopny rozpoznat molekuly na povrchu patogenů. Tyto látky se označují jako PAMP (pathogen associated molecular patterns). Mezi významné PRR patří Toll-like receptory, které jsou schopny rozpoznat látky vyskytující

se na povrchu patogenů, např. lipoproteiny, lipopolysacharidy a další. Aktivací těchto receptorů se spustí produkce prozánětlivých cytokinů, jakými jsou IL-1, IL-6, TNF a IL-8. (Hořejší, Bartůňková, 2009) Borelie jsou rozpoznávány Toll-like receptory 1 a 2 (TLR). Toto rozpoznání zapříčiní příval buněk imunitního systému do místa infekce. Nezralé dendritické buňky hrají podstatnou roli v komunikaci mezi místem infekce a sekundární lymfoidní tkání, jelikož dopraví antigen z místa infekce do místních lymfatických uzlin, kde ho spolu s MHC prezentují T lymfocytům. (Steinman, 1991) T lymfocyty se pomocí T-cell receptoru (TCR) naváží na MHC, a pokud obdrží i kostimulačních signál od jiných buněk imunitního systému, dojde k jejich pomnožení. (Hořejší, Bartůňková, 2009)



Obr. 6 Schéma aktivace klasické, lektinové a alternativní cesty komplementu, které se ve výsledku spojují do jedné, vedoucí k vytvoření MAC. Ab = protilátka, Ag = antigen, C1-INH = C1 inhibitor; MAC = membrane attack complex; MASP = MBL-associated serine protease; MBL = mannose-binding lectin; P = properdin. Převzato z, k dispozici on-line: http://www.merckmanuals.com/professional/sec13/ch163/ch163d.html

6 Vlastnosti klíštěcích slin

Vzhledem k faktu, že krev je jediným zdrojem potravy klíšťat (resp. samic), jsou pro ně nezbytné určité látky obsažené v jejich slinách, které mají schopnost potlačit jak imunitní odpověd hostitele, tak i např. koagulaci krve. Proto sliny krevsajících členovců obsahují protizánětlivé, protisrážlivé, vasodilatační a imunomodulační látky. (Ribeiro, Francischetti, 2002)

6.1 Antikoagulační látky

Hemostatická odpověď umožňuje savcům zastavit, či alespoň omezit ztráty krve z poraněného místa. Destičky v poškozeném místě přilnou na kolagenní vlákna v pojivové tkáni a uvolní látky, které umožní shlukování destiček. Destičky následně vytvoří zátku, která zamezí ztrátám krve. V případě většího poškození se vznik zátky podpoří sraženinou fibrinu. Destičky totiž uvolní srážecí faktory, které indukují přeměnu fibrinogenu (bílkovina plazmy) na aktivní fibrin, jenž vytvoří vlákna. (Campbell, Reece, 2008) Tato koagulační kaskáda se spustí ve chvíli, kdy se tkáňový faktor (TF) naváže na aktivovaný faktor VII (FVIIa). Komplex TF a FVIIa aktivuje faktor X, který následně štěpí protrombin na aktivní trombin. Trombin poté aktivuje fibrinogen na fibrin a vznikne nerozpustná fibrinová síť. (Levi, 2005)

Klíštěcí sliny prokazatelně obsahují látky bránící koagulaci a shlukování krevních destiček. Jednou z takových látek je protein pojmenovaný Ixolaris, izolovaný ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*. Tento protein inhibuje komplex FVIIa/TF, který aktivuje faktor X. (Francischetti et al., 2002)

6.2 Isac-like protein family

Alternativní cesta aktivace komplementu je klíčovým způsobem obrany hostitele proti patogenům. Sliny klíštěte *I. scapularis a I. ricinus* obsahují látky blokující kaskádu komplementu a usnadňují tak sání klíštěte na hostiteli. Do této rodiny řadíme proteiny Isac, IRAC I a II a Salp20 s podobným inhibičním účinkem na aktivaci komplementu. (Tyson et al., 2008)

6.2.1 Isac (*Ixodes scapularis* anti-complement)

Valenzuela et al. v r. 2000 popisuje ve své studii kódující sekvenci proteinu namířeného proti komplementu s názvem Isac (*I. scapularis* anti-complement). (Valenzuela et al., 2000) Isac naruší zformování C3 konvertázy z C3b a faktoru B navázáním na sérový protein properdin (Soares et al., 2005), což znemožní zformování C3 konvertázy a následkem toho nedojde k aktivaci alternativní cesty komplementu.

6.2.2 IRAC I, II (*Ixodes ricinus* anti-complement)

IRAC I a II jsou proteiny produkované ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*. Podobně jako Isac, blokuje alternativní cestu komplementu hostitele tak, že inhibují vazbu faktoru B na C3b a způsobuje vytlačení již navázaného faktoru B. Tyto proteiny jsou intenzivně produkovány během sání na hostiteli, avšak bylo dokázáno, že se nacházejí i ve slinách nenakrmeného klíštěte. Dá se tedy předpokládat, že IRAC má být jedním z prvních antigenů, které se do hostitele přenesou, aby inhibice alternativní cesty komplementu nastala co nejdříve. (Daix et al., 2007)

6.2.3 Salp20

Vzhledem k faktu, že tento protein má za cíl narušení aktivace alternativní cesty komplementu, je také řazen do tzv. ILP family. Jeho účinek spočívá v rozdělení zformované C3 konvertázy, tedy složky C3b a Bb. Salp20 vytlačí properdin (pozitivní regulátor C3 konvertázy, který má za úkol molekulu stabilizovat) z molekuly C3 konvertázy a urychlí tak její rozpad. C3 konvertáza je totiž bez navázaného properdinu nestálá. (Tyson et al., 2008)

6.3 IL-2 binding protein

Tento protein byl identifikován ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis*, způsobuje neutralizaci IL-2, a inhibuje tak i jeho účinek na proliferaci T lymfocytů. (Gillespie et al., 2001)

7 Slinami aktivovaný přenos (SAT – Saliva-acivated transmission)

Slinami aktivovaný přenos bezpochyby souvisí s látkami obsaženými ve slinách vektorů a jejich uvolňováním do rány společně s patogenem. Stále více důkazů ukazuje, že úspěšnost borelií a jiných patogenů závisí na jejich schopnosti využít farmakologicky účinné látky z klíštěcích slin. Tato spolupráce mezi vektorem a patogenem byla označena jako slinami aktivovaný přenos – Saliva-Activated Transmission (SAT). Termín SAT byl prvně použit pro podporu přenosu viru Thogoto z klíštěte druhu *Rhipicephalus appendiculatus*, nicméně od té doby byl popsán pro více patogenů přenášených nejen klíšťaty. (Nuttall, Labuda, 2004) Důkazy o SAT se totiž objevily i u některých patogenů přenášených jinými bezobratlými živočichy, např. *Leishmania* spp. a její přenašeč *Lutzomyia* a *Phlebotomus* (krevsající dvoukřídlý hmyz). (Belkaid et al., 1998)

V experimentálních podmínkách je SAT prezentován jako usnadnění přenosu a zlepšení infekčnosti patogena, který je přenesen injekčně spolu s extraktem ze slinných žláz (SGE – Salivary gland extract), ve srovnání se situací, kdy je přenesen pouze patogen sám. (Nuttall, Labuda, 2004) Toto tvrzení je dokázáno studií, provedenou Jones et al. v r. 1989. Injekční infikování morčat Thogoto virem a SGE v jednom místě zapříčinilo úspěšnější rozšíření viru na rozdíl od morčat, která byla infikována pouze virem. (Jones et al., 1989)

Slinami aktivovaný přenos funguje tedy nejen v případě borelií a klíšťat, ale také u jiných patogenů. Jedním takovým je i virus klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus – TBE). Tuto skutečnost ve své studii uvedl Labuda et al. v r 1993. Počet infikovaných klíšťat *I. ricinus* sajících na morčeti, které bylo infikováno TBE společně se slinnými extrakty (SGE), jež byly získány z částečně nasátých klíšťat, byl až čtyřnásobně vyšší na rozdíl od klíšťat sajících na morčatech, která byla infikována TBE s SGE z nenasátých klíšťat, či byla infikována pouze virem samotným. (Labuda et al., 1993) Podobný zlepšující účinek SGE z *I. ricinus* byl shledán i u jiných klíštěcích druhů, kterými jsou *Dermacentor reticulatus* a *Rhipicephalus appendiculatus*.

Na základě některých studií se dokonce předpokládá, že jistou formou SAT u klíšťat je i chemotaktická schopnost určitých složek slin. Tato skutečnost byla pozorována konkrétně u borelií, kdy jisté složky klíštěcích slin přilákají spirochety k místu sání neinfikovaného klíštěte a spolu s krví infikovaného hostitele přejdou do klíštěcího střeva. Tento děj je však prozatím spíše teoretického rázu a jeho konkrétní mechanismus není znám. (Nuttall, Labuda, 2004)

Během studií vyvstala na povrch i další pozoruhodná vlastnost SAT, ačkoliv prokázaná pouze v laboratorních podmínkách. Konkrétně se jedná o určitou spolupráci mezi patogenem a jeho vektorem. Tato pozorování byla učiněna jak u viru klíšťové encefalitidy a Thogoto viru, tak i u borelií. Slinné extrakty *Ixodes ricinus* zlepšily přenos a rozšíření *Borrelia lusitaniae*, ale již ne *B. burgdorferi* ss, zatímco slinné extrakty *I. scapularis* zvýšily počet *B. burgdorferi* ss, ale již nepodpořily rozšíření *B. lusitaniae*. (Zeidner et al., 2002) Na to, zda se SAT projeví má tedy nejspíše vliv jak druh patogena, tak i druh vektora a obratlovce, navíc SAT faktory se nejspíše v závislosti na druhu vektora a přenášeného patogena liší. (Nuttall, Labuda, 2004)

Do dnešní doby není známo, kolik konkrétních látek se SAT (Tab. I) účastní. Jisté již však je, že SAT faktory (Obr. 7) nejsou přítomné ve slinných žlázách klíštěte vždy, ale jsou sekretovány až během jeho sání na hostiteli. (Jones et al., 1992) V tomto okamžiku se totiž využije jejich zásadních vlastností, jakými jsou inhibice alternativní cesty komplementu (Valenzuela et al., 2000), fagocytózy patogena, inhibice aktivace T a B buněk, inhibice produkce zánětlivých cytokinů makrofágy a aktivita NK buněk. (Francischetti et al., 2009) Tyto vlastnosti jsou přínosné nejen pro klíště samotné, ale i pro borelie, které tím mají cestu do hostitele velmi usnadněnu. (Nuttall, Labuda, 2004) Látky zodpovědné za tyto klíčové vlastnosti byly již identifikovány. Jsou jimi například proteiny, soustředěné do velké rodiny homologních proteinů, zvaných Isac-like protein (ILP) family, do nichž náleží například Isac (Valenzuela et al., 2000), IRAC I, II a Salp20 (Daix et al., 2007). Dalšími proteiny jsou pak Salp15, IL-2 binding protein a CC chemokines-binding protein.

Tab. I Potenciální kandidáti na SAT faktory a jejich účinky.

Molekuly obsažené v SGE	Finální účinek	Citace
Inhibitory komplementu	Potlačení zánětlivé a imunitní odpovědi	(Tyson et al., 2008)
Histamine-binding proteins	Potlačení zánětu	(Paesen et al., 1999)
IL-2 binding protein	Inhibice proliferace T buněk	(Gillespie et al., 2001)
IL-8 binding protein	Inhibice neutrofilů	(Hajnická et al., 2011)
Inhibitory B buněk	Inhibice produkce protilátek a cytokinů	(Hannier et al., 2004)
Inhibitory T buněk	Inhibice buněčné a humorální imunitní odpovědi	(Francischetti et al., 2009)
Supresory NK buněk	Inhibice protivirové aktivity	(Kubeš et al., 1994)
Inhibitory makrofágů	Inhibice aktivity proti bakteriím	(Jaworski et al., 2001)

7.1 Salp15

Ačkoliv jsou již známy interakce mezi hostitelem a patogenem, vektorem a patogenem, či vektorem a hostitelem, s objevem proteinu Salp15 (15 kDa), který je obsažen ve slinách klíštěte *I. scapularis*, se naskytl nový vztah. Tato interakce se totiž projevuje mezi vektorem, patogenem a hostitelem, kdy vektor produkuje látku, která usnadní patogenu kolonizaci obratlovce.

Ramamoorthi et al. v r. 2005 ve své studii prezentuje fakt, že množství Salp15 ve slinných žlázách *I. scapularis* infikovaného *B. burgdorferi* je několikanásobně vyšší než u neinfikovaného. Navíc exprese Salp15 úzce souvisí právě s *B. burgdorferi*, jelikož množství Salp15 mRNA ve slinných žlázách klíštěte infikovaného bakterií *Anaplasma phagocytophilum*, což je další patogen přenášený klíštětem *I. scapularis*, zůstalo nezměněno. Zajímavou a velice významnou vlastností Salp15 je, že se váže na povrchový protein borelií OspC (Ramamoorthi et al., 2005) a chrání je tak před protilátkami zprostředkovaným zabitím a to in vitro i in vivo. (Hovius et al., 2008) Spolu s faktem, že se jeho exprese u infikovaných klíšťat zvýší, je klíčová role Salp15 v nastolení infekce a rozšíření borelií nesporná. K důkazu tohoto tvrzení byly do C3H myší injikovány borelie spolu se Salp15 a po 25 dnech byl výskyt borelií několikanásobně vyšší oproti kontrole, a to zejména v kůži, kloubech

a močovém měchýři. Množství borelií bylo vyšší než u myší, kterým byly borelie injikovány samostatně nebo u těch, kterým byl podán i Salp15, ale v jiné oblasti, než byly injikovány borelie. (Ramamoorthi et al., 2005)

Další vlastností proteinu Salp15 ze slinných žláz klíštěte *I. scapularis* je inhibice aktivace $CD4^+$ T buněk. Váže se totiž na proteinové komponenty na povrchu $CD4^+$ T lymfocytů a blokuje tak tok vápenatých iontů. Inhibice proliferace T lymfocytů vyústí v následné snížení produkce IL-2, který funguje právě jako stimulant proliferace T buněk. Salp15 se váže na receptor (TCR) na povrchu Th lymfocytů, konkrétně na CD4. Interakce mezi Salp15 a CD4 probíhá skrz C-terminální část proteinu Salp15. Tato vazba znemožní přenos aktivačního signálu a tím i proliferaci T buněk již v časné fázi infekce. (Garg et al., 2006)

Určitý vliv má protein Salp15 i na dendritické buňky. Ty jsou totiž zásadní pro započetí imunitní odpovědi, jelikož nesou antigen do lymfatických uzlin, kde ho prezentují T lymfocytům a způsobí tak jejich proliferaci. Potlačení této funkce je tedy pro klíště klíčové. Hovius et al. v r. 2008 ve své studii odhalil fakt, že protein Salp15 interaguje právě s dendritickými buňkami, které rozpoznávají antigen vazbou na Toll-like receptory, a inhibuje tak produkci některých prozánětlivých cytokinů, jakými jsou IL-12p70, IL-6 a TNF-α, a následně i aktivaci T-lymfocytů. DC-SIGN je C-type lektinový receptor na povrchu makrofágů a dendritických buněk, který se účastní procesu rozpoznání patogena. Salp15 se naváže na tento lektin na povrchu nezralých dendritických buněk a zapříčiní tak inhibici produkce prozánětlivých cytokinů. Klíštěcí sliny však obsahují mnoho látek, které mají ve výsledku velmi podobný inhibiční účinek. Důkazem pro toto tvrzení může být například prostaglandin E2, který je schopný blokovat produkci IL-6 a TNF-α. (Hovius et al., 2008)

Byly nalezeny homology proteinu Salp15 u evropského klíštěte *I. ricinus* (Iric-1, -2 a -3), avšak Iric-1 je nejvíce podobný právě Salp15 z *I. scapularis*. (Hovius et al., 2008)

Velice zajímavým zjištěním je potenciální vliv proteinu Salp15 na alergické astma. Inhibiční funkce tohoto proteinu na $CD4^+$ T lymfocyty a s tím i spojený pokles IL-2, byly využity k potlačení astmatu u myšího modelu. $CD4^+$ T lymfocyty jsou totiž podstatné

právě pro rozvoj alergického astmatu. Salp15 tedy v budoucnu může být využit k zamezení alergické senzitizace, podstatné k rozvoji alergického astmatu. (Paveglio et al., 2007)

7.2 Sialostatiny

Ve slinách klíšťat je obsaženo velké množství inhibitorů proteáz. Konkrétně cystatiny jsou inhibitorem C1-typu cysteinových proteáz, jímž je např. katepsin u savců. Cysteinové proteázy jsou velice rozšířené a hrají svou úlohu v mnoha bilogických dějích obratlovců, jakými jsou například vývoj imunitního systému, neovaskularizace, chemotaxe neutrofilů během zánětu, apoptóza a mnoho dalších, avšak neméně podstatných úloh. Cystatiny dělíme na tři typy, cystatiny 1, 2 a 3. Cystatiny 1 (někdy označované jako stefiny) jsou intracelulární proteiny cytosolu. Rodina cystatinů 2 (vykazují největší podobnost se sialostatinem L a L2 – zmíněny níže) obsahuje veškeré sekretované cystatiny a cystatiny 3, které jsou často označované jako kininogeny. Jak bylo zjištěno, cystainy se vyskytují i u bezobratlých organismů a hrají důležitou roli i při úniku před imunitním systémem a jeho ovlivněním. Kotsyfakis et al. v r. 2006 popsal 2 cystatiny ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*, konkrétně sialostatin L a sialostatin L2. Sialostatin L je specificky namířen proti katepsinu L, vykazuje i protizánětlivou reakci a potlačuje maturaci dendritických buněk a proliferaci CTL (cytotoxických T lymfocytů). (Kotsyfakis et al., 2006) Sialostatin L2 se objevuje ve zvýšeném množství u sajícího klíštěte, zatímco hladina sialostatinu L během tohoto procesu mírně klesá. Ve chvíli, kdy byla genová exprese sialostatinu L2 potlačena, výrazně se zhoršila schopnost klíštěte přijímat potravu, zhoršil se jeho růst a kleslo množství vyprodukovaných vajíček, což naznačuje, že sialostatin L2 má podstatný vliv na příjem potravy klíštětem. (Kotsyfakis et al., 2007) Tyto skutečnosti naznačují důležitý vliv sialostatinů na přenos borelií a následné nastolení infekce, pomocí ovlivnění intracelulárních a extracelulárních katepsinů obsažených v imunitním mechanismu hostitele. V okamžiku, kdy byly spirochety *B. burgdorferi* injikovány do myšího modelu společně se sialostatinem L2, jejich počet byl po čtyřech dnech téměř šestinásobně vyšší oproti kontrole i oproti případu, kdy byly spirochety injikovány společně se sialostatinem L. Samotný sialostatin L2 nevykazuje vliv na proliferaci borelií *in vitro*. Možnost interakce mezi sialostatinem L2 a některým z povrchových proteinů borelií byla zkoumána, avšak nebyl zde shledán žádný podstatný rozdíl v počtu borelií oproti kontrole. Tedy možnost, že se sialostatin L2 váže

na borelie pomocí interakce s některým z jejich povrchových proteinů (podobně jako Salp15), se neprokázala. (Kotsyfakis et al., 2010) Sialostatin L2 je tedy dnes považován za další SAT faktor.

7.3 B-cell inhibitory protein (BIP)

Jako další potenciální SAT faktor se projevuje i B-cell inhibitory protein, obsažený ve slinách klíštěte *I. ricinus.* Tento protein má schopnost potlačit proliferaci B buněk, které hrají jednu z klíčových úloh v antimikrobiální imunitě. Navíc bylo zjištěno, že potlačuje proliferaci B buněk, která byla vyvolána jako reakce na přítomnost povrchových proteinů borelií OspA a OspC v hostiteli a tím usnadní boreliím jak přenos, tak následné rozšíření. (Hannier et al., 2004)

7.4 IL-2 binding protein

Potenciálním SAT faktorem se může jevit i IL-2 binding protein, který byl prezentován ve studii Gillespe et al. v r. 2001. V této studii je popsán přímý vliv slin klíštěte *I. scapularis* na IL-2. Za tento účinek je zodpovědný právě IL-2 binding protein, který v důsledku potlačuje i proliferaci T buněk. U parazitů a patogenů se nám tímto předkládá vůbec první důkaz o proteinu, který zacílil svůj účinek přímo na daný cytokin. IL-2 navíc svým účinkem ovlivňuje nejen T lymfocyty, ale i jiné imunitní buňky, které exprimují IL-2 na svém povrchu. Těmito buňkami jsou například B buňky, NK buňky, cytotoxické lymfocyty, neutrofily a makrofágy. (Gillespie et al., 2001)

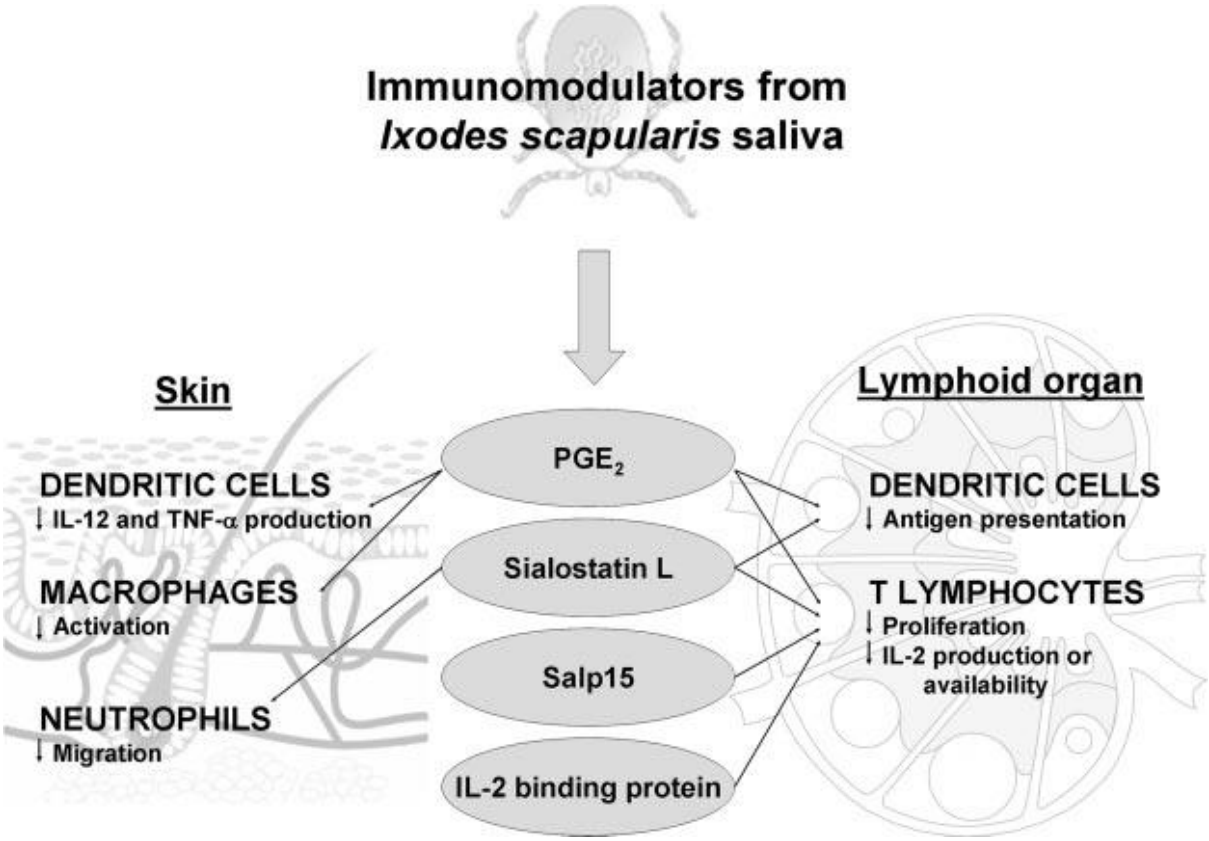
7.5 Histamine release factor (tHRF)

Ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* byl objeven tzv. histamine release factor (tHRF), tedy protein, který umožňuje klíštěti stimulovat sekreci histaminu v hostiteli. Dai et al. v r. 2010 zkoumal jeho vliv na sání klíštěte a s tím i spojený přenos *B. burgdorferi* jako původce Lymeské nemoci. (Dai et al., 2010)

Ačkoliv klíštěcí sliny obsahují tzv. histamine binding proteins (HBP) mající za úkol neutralizovat zánětlivý efekt histaminu, který je sekretován imunitními buňkami hostitele do místa klíštěcího sání, (Paesen et al., 1999) obsahují i tHRF. Tento protein stimuluje produkci histaminu v hostiteli tak, že se váže na basofily hostitele a stimuluje

je k uvolňování histaminu. Bylo zjištěno, že množství tHRF ve slinách klíštěte stoupá během sání na hostiteli a je výrazně vyšší u klíšťat infikovaných spirochetami *B. burgdorferi*. Potlačením produkce tHRF, dojde k přenosu menšího množství spirochet do hostitele a následně je znesnadněno i jejich rozšíření.

Účinky HBP a tHRF by se mohly zdát protichůdné, avšak bylo zjištěno, že klíště tyto látky produkuje v odlišné fázi sání. Zatímco klíště produkuje zvýšené množství HBP během časné fáze sání, kdy musí čelit účinku histaminu, během pozdní fáze sání je již klíště na účinek histaminu méně citlivé a začne tedy produkovat ve zvýšeném množství tHRF, naopak exprese HBP se výrazně sníží. Sekretovaný histamin pak nejspíše usnadní tok krve do místa sání klíštěte a podpoří tak jeho příjem krve. (Dai et al., 2010)



Obr. 7 Imunomodulační látky obsažené ve slinách či SGE klíštěte *I. scapularis*.
Převzato z: (Sá-Nunes et al., 2007)

8 Vakcinace

Ve vyspělém světě je Lymeská borelióza jednou z nejčastějších zoonóz způsobených spirochetou ze skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato, primárně přenášenou klíšťaty ze skupiny *Ixodes*. V současné době prozatím nemáme k dispozici vakcínu, která by člověka spolehlivě ochránila. (Schuijt et al., 2010) Vývoj vakcín proti klíšťatům by se dal do jisté míry rozdělit do tří směrů, a to na vakcíny založené na exponovaných antigenech, vakcíny založené na skrytých antigenech a dále na vakcíny, ve kterých se oba typy antigenů mísí. (Nuttall et al., 2006) Exponované antigeny jsou antigeny, které se dostávají přímo do klíštětem poškozeného místa na hostiteli. Obvykle to jsou proteiny produkované slinnými žlázami klíštěte, a jsou tedy obsažené v klíštěcích slinách. Tyto antigeny vyvolávají u hostitele imunitní odpověď a jsou přeneseny pomocí dendritických buněk do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen T lymfocytům. (Hovius et al., 2008) Skryté antigeny se do styku s imunitním systémem hostitele prakticky nedostanou, jelikož jsou obsaženy například ve stěně klíštěcího střeva a zde interagují se specifickými imunoglobuliny z krve hostitele. V podstatě jakýkoliv skrytý antigen, který přichází uvnitř klíštěte do styku s imunoglobuliny hostitele a zajišťuje určité vitální funkce klíštěte, může být potencionálním kandidátem na vytvoření vakcíny. (Nuttall et al., 2006)

8.1 OspA vakcíny

Nemalá pozornost byla při vývoji vakcín zaměřena na povrchové proteiny borelií. Ty jsou totiž klíčové pro jejich přežití v různých hostitelích a rovněž pro úspěšnou transmisi.

Dvě farmaceutické společnosti vyvinuly vakcíny proti Lymeské borelióze (LYMErix, ImuLyme). Obě byly založeny na povrchovém proteinu borelií OspA a prošly klinickým testováním na lidech. (Shen et al., 2011) Nakonec byla ale schválena pouze vakcína LYMErix, a to v roce 1998. Jedinci, kteří podstoupili tuto vakcinaci, vykazovali po třech dávkách z 80% rezistenci vůči infekci způsobené *B. burgdorferi*. (Steere et al., 1998) Tato vakcína obsahovala 30 μg rekombinantní OspA a byla podávána jedincům ve třech dávkách v intervalu 1 a 12 měsíců po první dávce a byla určena pro jedince ve věku 15 – 70 let. (Shen et al., 2011) Nevýhodou této vakcíny však bylo, že u cca 5% jedinců se nevyvinula dostatečná protilátková odpověď na OspA. (Schuijt et al., 2010) Vysoký titr protilátek se ale v příjemci dlouho neudržel, proto musely být podávány další dávky vakcíny, aby se hladina protilátek udržela v dostatečné výši. (Steere et al., 1998) Vhledem k těmto a dalším okolnostem, jako

byl i poněkud častý výskyt artritidy u příjemců vakcíny, byl LYMErix po čtyřech letech stažen z prodeje. (Shen et al., 2011)

8.2 OspC vakcíny

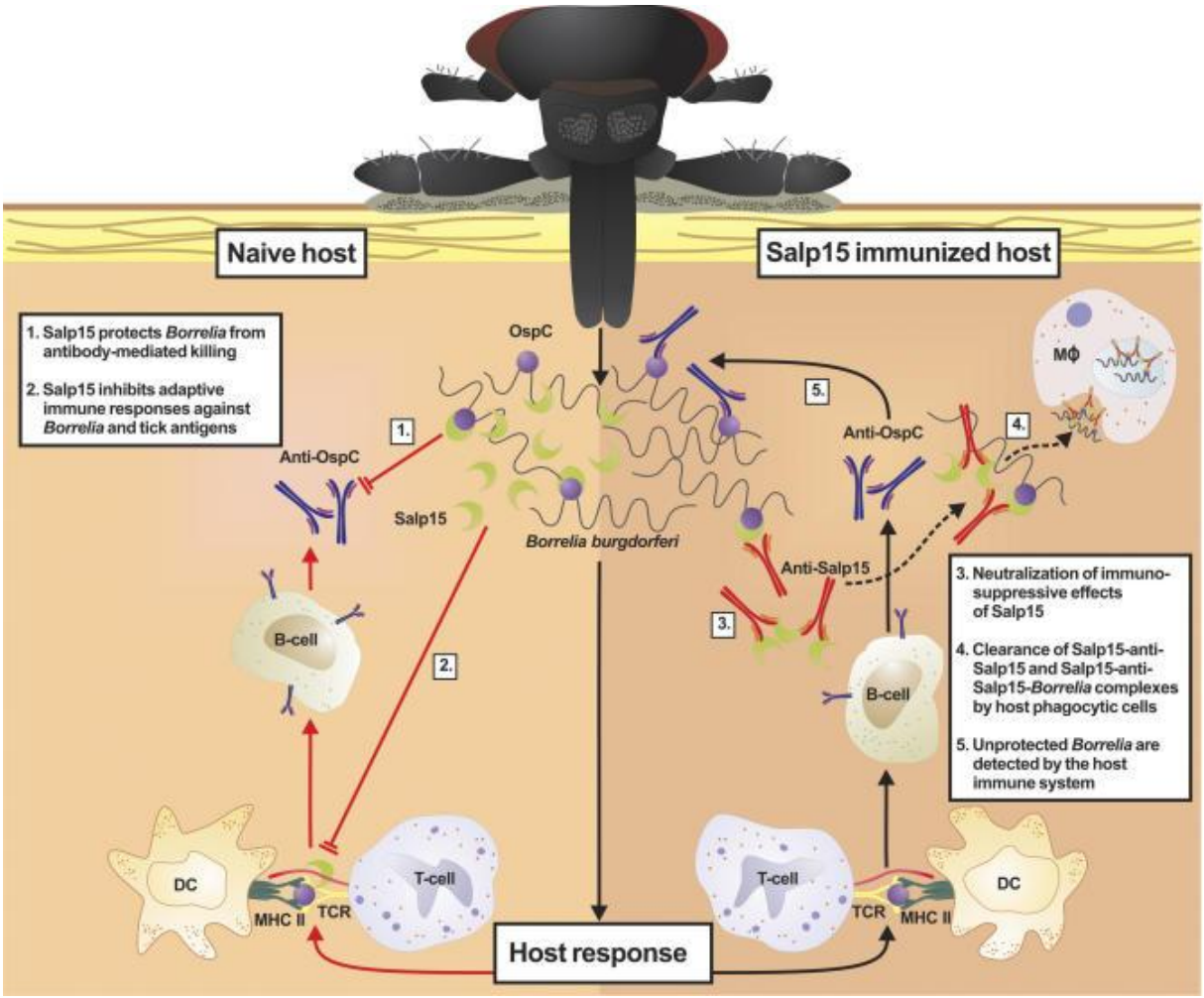
Další alternativou boje proti boreliím jsou vakcíny založené na povrchovém proteinu OspC. Studie již prokázaly, že jsou schopny zajistit účinnou ochranu. (Gilmore et al., 1996) Ačkoliv jednou z velkých nevýhod těchto vakcín je, že OspC je u jednotlivých druhů borelií velice heterogenní.

8.3 DbpA vakcíny

Do jisté míry úspěšným kandidátem na vakcínu byl další povrchový protein DbpA. Imunizace tímto proteinem vyvolala u myší potřebnou protilátkovou odpověď proti boreliím, ale pouze v případě, že byly borelie podány injekčně a kultivovány in vitro. Pokud došlo k přenosu borelií klíštětem, ochrana již nebyla zjevná. (Hagman et al., 2000) Tato skutečnost jen dále podporuje a do jisté míry i dokazuje teorii slinami aktivovaného přenosu.

8.4 Salp15 vakcíny

Další uvažovanou možností je vakcína založená na Salp15, jelikož tento protein obsažený ve slinách klíšťat se váže na povrchový protein borelií OspC a tím je chrání před imunitou hostitele (Obr. 8). (Ramamoorthi et al., 2005) Nedávné studie prokázaly, že Salp15 antiserum ochránilo myši před infekcí boreliemi. Zajímavostí je, že také znatelně zlepšilo ochrannou schopnost protilátek proti antigenům, jakými jsou OspA a OspC. Myši pasivně imunizované tímto antisérem byly znatelně ochráněny před boreliemi přenesenými přímo klíštětem. Vakcinace pomocí molekul vektora, které patogen potřebuje k úspěšnému přenosu a rozšíření, se tak stává dalším potenciálním způsobem, jak bojovat proti borelióze, ale i jiným podobně přenášeným nemocem. (Dai et al., 2009)



Obr. 8 Schéma popisující účinek vakcín zamířených proti proteinu Salp15 a způsob jakým mohou zabránit přenosu *B. burgdorferi*. Převzato z: (Hovius et al., 2008)

8.5 Vakcíny založené na skrytých antigenech

Výsledek vakcinace pomocí exponovaných i skrytých antigenů je podobný, tedy zvýšení mortality klíšťat a snížení množství nasáté krve a tím i snížení počtu vajec. Avšak způsob účinku vakcíny proti skrytým antigenům je naprosto odlišný. (Nuttall et al., 2006) Tyto antigeny totiž nevyvolávají imunitní odpověď během sání klíštěte, ale ve chvíli, kdy jsou připraveny jako extrakt z klíštěcí tkáně a injikovány do hostitele, stávají se imunogenními. V hostiteli, kterému byla podána vakcína se skrytými antigeny, se indukuje vznik specifických imunoglobulinů, které klíště nasaje společně s hostitelskou krví. Protilátky následně interagují se skrytými antigeny přítomnými na povrchu střevní stěny klíštěte, způsobí prasknutí stěny a následné vylití střevního obsahu do tělní dutiny klíštěte. To způsobí jeho smrt. (Rand et al., 1989)

8.5.1 Vakcíny založené na proteinu ferritin

Během sání se klíště musí vypořádat s příjmem obrovského množství železa, které přijímá společně s hostitelskou krví. Ferritiny jsou v tomto procesu klíčovými proteiny, které železo následně uskladňují. Klíšťata obashují dva typy ferritinů, vnitrobuněčný ferritin 1 a sekretovaný ferritin 2, který u obratlovců nemá obdoby. Ferritin 2 (FER2) slouží jako primární transportní protein železa, nacházející se v klíštěcím střevě, odtud je sekretován do hemolymfy, kde slouží jako přenašeč železa do periferálních tkání. Železo je totiž nejspíše velmi důležité pro správný vývoj embryí. FER2 se navíc vyskytuje u všech vývojových stádií klíšťat. Potlačení produkce FER2 mělo za následek zvýšenou úmrtnost klíšťat po sání, redukci váhy a fertility. (Hajdusek et al., 2009) Vakcinace rekombinantním FER2 měla podobný účinek jako potlačení jeho produkce v klíštěti. Fakt, že hostitel vakcinovaný FER2 protilátkami byl proti klíšťatům ochráněn, se může vysvětlit několika způsoby. Jedna z možností je, že se protilátky navázaly na FER2 uvnitř buněk střeva a znemožnily tak FER2 správně fungovat, což vedlo ke špatnému zpracování a následnému uvolnění železa z buněk. Samotné železo následně může mít poškozující vliv na klíště. Druhou možností je, že protilátky interferovaly s FER2 v hemolymfě a zabránily tak přenosu železa do periferní tkáně. (Hajdusek et al., 2010) FER2 se tedy do jisté míry osvědčil jako účinný antigen, vhodný pro další zkoumání a v budoucnu možná i pro vakcinaci.

8.6 Duální vakcíny

Ideální vakcína by měla učinkovat na více druhů klíšťat a postihnout nejlépe všechna jejich vývojová stádia (larva, nymfa, dospělec). Konkrétně duální vakcíny musejí vykazovat ještě jednu velice podstatnou vlastnost, a to zacílit jak exponované, tak i skryté antigeny.

8.6.1 Vakcíny založené na 64P

Antigenem použitelným pro vývoj duální vakcíny by mohl být protein 64P (15 kDa) z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, vyskytující se v cementu klíšťat, jehož funkcí je upevnit klíště v místě sání. Tento protein má podobné složení jako keratin a kolagen, které jsou obsaženy v pokožce a škáře hostitele, čímž je zajištěno, že nebude odmítnut imunitním systémem hostitele. (Trimnell et al., 2005) Ačkoliv tento protein patří mezi exponované antigeny, vykazuje zkříženou reaktivitu s antigenními epitopy ve střevě, hemolymfě a slinných žlázách dospělých klíšťat, nymf i larev. Způsob účinku jeho rekombinantní verze 64TRP spočívá v indukci humorální a oddálené hypersenzitivní odpovědi, které postihnou klíště jak v místě sání, tak poruší i integritu jeho střeva, což způsobí smrt klíštěte. Navíc je zkříženě reaktivní proti různým vývojovým stádiím a způsobuje úmrtnost klíšťat až z 80%. (Nuttall et al., 2006)

9 Diskuze

Lymeská borelióza je jednou z nejčastějších zoonóz způsobených spirochetou *Borrelia burgdorferi*, objevujících se ve vyspělém světě. Tento patogen potřebuje ke svému přenosu vektor, kterým je nejčastěji klíště ze skupiny *Ixodes*. Jakmile jsou borelie přeneseny do hostitele, jímž je v mnoha případech i člověk, začnou se nekontrolovatelně množit a šířit po okolních tkáních. V časné fázi infekce, která se v mnoha případech projeví jako tzv. erythema migrans (červená migrující skvrna), se tato nemoc dá úspěšně a bez následků vyléčit běžně dostupnými antibiotiky, neléčená však má za následek mnoho vážných komplikací, mezi které řadíme nejčastěji artritidy, což souvisí s výskytem borelií v kloubech, či bolestivé záněty míšních kořenů a mozkomíšních plen.

B. burgdorferi je schopna produkovat na svém povrchu mnoho proteinů, které jí usnadňují kolonizaci jak bezobratlých (klíště), tak obratlovčích hostitelů, do kterých je klíšťaty následně přenesena. Tyto proteiny jsou exprimovány v různém množství, v závislosti na prostředí, v němž se borelie aktuálně nacházejí, a z části v závislosti na okolních podmínkách (zahrnuje změnu pH, okolní teploty). Je však nezbytné pro budoucí studie pochopit přesný způsob, jakým je řízena a ovlivňována produkce proteinů, klíčových pro adaptaci a přežití borelií v jednotlivých hostitelích.

Vzhledem k tomu, že se borelie váží jak ve vektoru, tak v koncovém hostiteli na receptory různých tkání, je velmi podstatné poznat právě tyto receptory a mechanismus jakým se na ně borelie váží. To by mohlo v budoucnu vést k možnému narušení vazby na receptor, a tedy i ke znemožnění dlouhodobého přetrvávání borelií v tkáních. Dnes jsou již známy interakce mezi proteiny klíšťat a borelií. Ve chvíli, kdy se borelie ocitnou společně s nasátou krví v klíštěcím střevě, dochází k interakci mezi jejich povrchovým proteinem OspA a klíštěcím receptorem TROSPA. Tato interakce umožní boreliím setrvat ve střevě až do dalšího sání, kdy se borelie přesunou do slinných žláz klíštěte, kde ve vysokém množství exprimují další povrchový protein OspC. Zde navíc dochází pro borelie k zásadní interakci mezi OspC a proteinem klíštěcích slin Salp15. Tato vazba boreliím poskytne velmi účinnou ochranu před imunitním systémem hostitele, jelikož Salp15 inhibuje rozvoj imunitní odpovědi hostitele a poskytne jim tak čas k úspěšnému rozšíření a kolonizaci tkání.

Salp 15 nejspíše nebude jedinou a poslední látkou, která interaguje přímo s boreliemi a umožňuje jim tak snadný přenos do hostitele, je ale předmětem zkoumání, které další látky by mohly přenášený patogen podobně zvýhodnit.

V posledních letech významně narostl počet identifikovaných látek v klíštěcích slinách, které jednak potlačují odpověď hostitele na sání klíštěte a dále jistým způsobem interagují s přenášeným patogenem. Není dnes již pochyb, že právě klíštěcí sliny nebo SGE (salivary gland extracts) výrazně podporují rozšíření borelií v hostiteli a usnadňují tak i kolonizaci jeho tkání. Tuto pozoruhodnou „spolupráci“ mezi vektorem a přenášeným patogenem nazýváme slinami aktivovaný přenos (SAT). Slinami aktivovaný přenos byl identifikován u mnoha patogenů přenášených nejen klíšťaty, ale například i krevsajícím dvoukřídlým hmyzem, jako jsou *Lutzomyia* a *Phlebotomus*, přenašeči parazitického prvoka *Leishmania* spp. SAT byl pozorován dokonce u viru Thogoto a viru klíšťové encefalitidy. V konkrétním případě interakce mezi boreliemi a klíšťaty máme v současné době oficiálně identifikovány dva SAT faktory a to Salp15 a sialostatin L2. Oba tyto SAT faktory jsou produkovány během sání klíštěte, avšak podstatným rozdílem mezi nimi je, že sialostatin L2 neinteraguje přímo s boreliemi jako v případě Salp15. Sliny klíšťat však obsahují obrovské množství látek s imunomodulačními vlastnostmi, a proto tento počet SAT faktorů rozhodně nebude konečný. Důkazem pro toto tvrzení může být i BIP (B-cell inhibitory protein), který potlačuje proliferaci B buněk způsobenou povrchovými proteiny borelií (OspA, OspC). V nedávné době byl objeven vliv Salp15 na potlačení alergického astmatu, což naznačuje skutečnost, že jednotlivé imunomodulační látky z klíštěcích slin (a nejen z nich) by mohly být využity i v jiných oblastech než jen jako cíle potenciálních vakcín. Do jisté míry účinným SAT faktorem je i tzv. histamine release factor (tHRF). Tento protein objevený ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* je významný především v pozdní fázi sání, kdy je ve vysoké míře sekretován. Jeho schopnost spočívá ve stimulaci basofilů hostitele k uvolňování histaminu. Dá se tedy předpokládat, že vasodilatační účinek histaminu umožňuje boreliím úspěšnější rozšíření z místa sání klíštěte do vzdálenějších oblastí hostitele.

Velice zásadním problémem je, že ačkoliv se výskyt klíšťaty přenášených nemocí neustále zvyšuje, a to i ve vyspělých zemích, nebyla prozatím nalezena spolehlivá vakcína proti naprosté většině z nich. K vyřešení tohoto problému bude nejspíše zapotřebí detailního prozkoumání a pochopení interakcí mezi vektorem, patogenem a hostitelem. Mapování látek obsažených ve slinách vektorů a látek interagujících s přenášeným patogenem však přináší

jistou naději, že v budoucnu bude vytvořena vakcína, která by účinně fungovala. Účinek vakcíny může buď znemožnit sání vektora, a tedy i přenos patogena, či přenesený patogen zcela zahubit. V klíštěcích slinách se již podařilo objevit mnoho látek ovlivňující jak imunitní odpověď hostitele, tak umožňující rozšíření patogena po hostiteli buď nepřímo, tedy potlačením imunitní odpovědi hostitele (primárně ale za účelem úspěšného sání klíštěte), či přímo interagujících s patogenem (vazba již zmíněného proteinu Salp15 na OspC borelií). Zda ale vakcína zacílená proti těmto látkám, či vakcína kombinující několik těchto látek bude účinná, je prozatím předmětem výzkumů a stále nezodpovězenou otázkou.

Výjimku mezi nemocemi, proti kterým prozatím nemáme spolehlivou vakcínu, netvoří ani Lymeská borelióza, ačkoliv v minulosti se již jedna vakcína dostala až do komerčního prodeje. Tato vakcína však byla zanedlouho stažena z prodeje hlavně díky následně vznikající artritidě u vakcinovaných pacientů. Vytvoření univerzální vakcíny, která bude založena na jednom konkrétním antigenu a bude účinná proti veškerým patogenům přenášeným klíšťaty, však nebude možné. Klíšťata totiž přenášejí jak bakterie, tak viry a v koncovém hostiteli se proti nim uplatňují odlišné imunitní mechanismy. Zatímco v boji proti bakteriím se uplatňuje především alternativní cesta komplementu a fagocytóza makrofágů, u virů se uplatňují hlavně interferony a jiné cytokiny. Infekce způsobená viry i bakteriemi je navíc doprovázena zánětem. Tak jak se liší různý způsob imunitní odpovědi na viry a bakterie, stejným způsobem se liší i proteiny, které přenos do hostitele doprovázejí.

Molekuly klíštěcích slin působí redundatně, v praxi to znamená, že zacílení pouze jedné molekuly vakcínou může sice způsobit její inhibici, avšak další molekuly obsažené ve slinách jsou schopny její funkci alespoň zčásti nahradit. Toto prolínání účinků jednotlivých látek je pro klíště nejspíše jediným, zato velmi úspěšným způsobem, jak obejít ochranné systémy hostitele a získat tak dostatečné množství potravy, dále se vyvíjet a množit. Přenos borelií či sání klíštěte může být po potlačení pouze jedné látky ve výsledku znesnadněn, nikoliv však přerušen. Na druhou stranu vakcíny založené na exponovaných antigenech, jakými jsou například slinné proteiny, mají jednu zásadní výhodu - u vakcinovaného jedince totiž každé další sání klíštěte způsobí opakovanou imunizaci a funguje zde tedy jako booster, což znamená, že po každém sání se zvýší či obnoví množství protilátek přítomných v hostiteli. Tato skutečnost však neplatí u vakcín, které jsou založené na skrytých antigenech. S těmito antigeny totiž hostitel během sání klíštěte nepřichází do styku, a tedy opakovaná imunizace způsobená dalším sáním klíštěte není možná. Proto by bylo nutné imunizaci uměle

(injekčně) opakovat. Naprosto ideálním řešením tohoto problému se zdají být tzv. duální vakcíny, které využívají výhodných vlastností obou typů již zmíněných vakcín. Antigeny použité pro vakcinaci jsou přítomné ve slinách, přicházejí tedy do styku přímo s hostitelem a zkříženě reagují s vnitřním prostředím vektora. Horkým kandidátem pro tento druh vakcíny se zdá být protein 64P, který je přítomný v cementu klíšťat a zkříženě reaguje s antigenními epitopy v různých tkáních klíšťat, včetně střeva. Silná humorální a hypersenzitivní odpověď na tento antigen způsobí totiž přerušení sání klíštěte a naruší jeho vnitřní tkáně, což zapříčiní jeho smrt. V duálních vakcínách spatřuji velký potenciál a snad i budoucí řešení, jak zabránit šíření klíšťaty přenášených patogenů, jelikož ve chvíli, kdy klíště není ihned od začátku schopno úspěšně sát, není pravděpodobný ani přenos patogenů v něm obsažených.

10 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se podrobně zabývala problematikou přenosu patogenů aktivovaného klíštěcími slinami (SAT). Studování tohoto velmi rozsáhlého tématu mi umožnilo pochopit složité interakce mezi vektory a patogeny, které přenášejí. Úloha slin v tomto přenosu spočívá zřejmě v jejich modulačním (supresivním) účinku na imunitu hostitele a vytvoření příznivých podmínek pro množení a šíření patogena. V klíštěcích slinách bylo již nalezeno několik proteinů s prokazatelnou SAT aktivitou. Tyto SAT faktory a další, které budou objeveny, by se mohly stát základem takzvaných „trans-block“ vakcín zabraňujících přenosu patogenů z vektora na hostitele. Vakcíny obsahující jak antigeny slin, tak tzv. skryté antigeny klíšťat (duální vakcíny) by pak mohly indukovat imunitu postihující jak sání samotného klíštěte, tak přenos patogenů tímto vektorem. V každém případě vyžaduje vývoj vakcín proti klíšťatům další studium imunitních interakcí v trojúhelníku patogen – vektor – hostitel. Právě vakcíny jsou také součástí mé práce, jelikož mohou být založeny na antigenech klíštěcích slin. Věřím, že intenzivní výzkum na poli látek obsažených ve slinách a na poli vzájemných interakcí mezi vektorem, patogenem a hostitelem povede k vývoji účinné ochrany před patogenem nebo vektorem samotným.

11 Citovaná literatura

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W. R, Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenaze, P. W., Rimcon, M., Kantor, F. S., Fikrig, E. 2002. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4 T cell activation. *Immunity* 16: 849–859.

Balmelli, T., Piffaretti, J. 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 146: 329-340.

Barbour, A.G. 1988. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* 26: 475-478.

Bartůněk, P., Bojar, M., Calda, P., Diblík, P., Hercogová, J., Hoza, J., Hulínská, D., Janovská, D., Pícha, D., Valešová, M., Petrášek, J. 2006. Lymeská borelióza. *Grada publishing*.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D. L. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 188: 1941–1953.

Brown, E. L., Wooten, R. M., Johnson, B. J. B., Iozzo, R. V., Smith, A., Dolan, M. C., Guo, B. P., Weis, J. J., Höök, M. 2001. Resistance to Lyme disease in decorin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107: 845-852.

Campbell, N. A., Reece, J. B. 2008 Biologie. *Computer press*. 884-885.

Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R. J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser. C. M. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35: 490-516.

Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charloteaux, B., Decrem, Y., Prévôt, P. P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE* 3: 1-24.

Crowley, H., Hubert, B. T. 2003. Host-adapted *Borrelia burgdorferi* in mice expresses OspA during inflammation. *Infect. Immun.* 71: 4003-4010.

Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., Fikrig, E. 2010. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog.* 6: 1-10.

Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., Narasimhan, S., Anguita, J., Fikrig E. 2009. Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe* 6: 482–492.

Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J. P., Chiappino, I., Gillet, L., de Fays, K., Decrem, Y., Leboulle, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P. P., Gern, L., Sharp, P.M., Vanderplasschen, A. 2007. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol. Biol.* 16: 155-166.

El-Hage, N., Stevenson, B. 2002. Simultaneous coexpression of *Borrelia burgdorferi* Erp proteins occurs through a specific, erp locus-directed regulatory mechanism. *J. Bacteriol.* 184: 4536-4543.

Feng, S., Hodzic, E., Stevenson, B., Barthold, S. W. 1998. Humoral immunity to *Borrelia burgdorferi* N40 decorin binding proteins during infection of laboratory mice. *Infect. Immun.* 66: 2827–2835.

Fikrig, E., Feng, W., Barthold, S. W., Telford, S. R., Flavell, R. A. 2000. Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 Expression and the inhibition of spirochete transmission. *J. Immunol.* 164: 5344-5351.

Fikrig, E., Narasimhan, S. 2006. *Borrelia burgdorferi* - Traveling incognito? *Microbes Infect.* 8: 1390-1399.

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

Francischetti, I. M. B., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14: 2051-2088.

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

Franz, J. K., Krause, A. 2003. Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 17: 241–264.

Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O., Venter, J. C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.

Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., Ashish, Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J.K., Fikrig, E., Yengo, C.M., Anguita, J. 2006. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J. Immunol.* 117: 6579-6583.

Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C. A., Charon, N. W. 1998. Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180: 2418–2425.

Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., Titus, R. G. 2001. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol.* 166: 4319-4326.

Gilmore, R. D., Kappel, K. J., Dolan, M. C., Burkot, T. R., Johnson, B. J. 1996. Outer surface protein C (OspC), but not P39, is a protective immunogen against a Tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: Evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect. Immun.* 64: 2234–2239.

Hagman, K. E., Yang, X., Wikel, S. K., Schoeler, G. B., Caimano, M. J., Radolf, J. D., Norgard, M. V. 2000. Decorin-binding protein A (DbpA) of *Borrelia burgdorferi* is not protective when immunized mice are challenged via tick infestation and correlates with the lack of DbpA expression by *B. burgdorferi* in ticks. *Infect. Immun.* 68: 4759–4764.

Hajdusek, O., Almazán, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopacek, P., de la Fuente, J. 2010. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 28: 2993-2998.

Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., Winzerling, J., Grubhoffer, L. 2009. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106: 1033-1038.

Hajnická, V., Kocáková, P., Sláviková, M., Slovák, M., Gasperík, J., Fuchsberger, N., Nuttall, P. A. 2011. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* 23: 483-489.

Halouzka, J., Postic, D., Hubálek, Z. 1998. Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. *Med. Vet. Entomol.* 12: 103-105.

Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., Bowman, A. S. 2004. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology* 113: 401-408.

Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I. J., Meri, S. 2001. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276: 8427-8435.

Hodzic, E., Feng, S., Freet, K. J., Borjesson, D. L., Barthold, S. W. 2002. *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect. Immun.* 70: 3382–3388.

Hořejší, V., Bartůňková, J. 2009 Základy imunologie. *TRITON*. 30-50.

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

Hovius, J. W. R., de Jong, M. A., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. 2008. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog* 4: 1-14.

Hovius, J. W. R., Levi, M., Fikrig, E. 2008. Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med.* 5: 202-208.

Hovius, J. W. R., Schuijt, T. J., de Groot, K. A., Roelofs, J. J., Oei, G. A., Marquart, J. A., de Beer, R., van 't Veer, C., van der Poll, T., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., van Dam, A. P. 2008. Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus saliva*. *J. Infect. Dis.* 198: 1189-1197

Hübner, A., Yang, X., Nolen, D. M., Popova, T. G., Cabello, F. C., Norgard, M. V. 2001. Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 12724-12729.

Jaworski, D. C., Jasinskas, A., Metz, C. N., Bucala, R., Barbour, A. G. 2001. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol.* 10: 323-331.

Jones, L. D., Hodgson, E., Nuttall, P. A. 1989. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* 70: 1895-1898.

Jones, L. D., Kaufman, W. R., Nuttall, P. A. 1992. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experientia* 48: 779-782.

Karkkonen, K., Stiernstedt, S. H., Karlsson, M. 2001. Follow-up of patients treated with oral doxycycline for Lyme neuroborreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 33: 259-262.

Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., Ribeiro, J, M. 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 281: 26298–26307.

Kotsyfakis, M., Horká, H., Sálat, J., Andersen, J.F. 2010. The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol. Microbiol.* 77: 456-470.

Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282: 29256–29263.

Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F. 2001. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and factor H. *Eur. J. Immunol.* 31: 1674–1684.

Krejsek, J., Kopecký, O. 2004 Klinická imunologie. *NUCLEUS HK*. 144-145.

Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., Weigl, E. 2007. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 151: 175-186.

Kubeš, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffová, E., Nuttall, P. A. 1994. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. *Immunology* 82: 113-116.

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B. J., Koide, S., Dunn, J. J., Lawson, C. L., Swaminathan, S. 2001. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO J.* 20: 971-978.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., Kraiczy, P. 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends Microbiol.* 10: 74-79 .

Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., Nuttall, P. A. 1993. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.* 7: 193-196.

Levi, M. 2005. New antithrombotics in the treatment of thromboembolic disease. *Eur. J. Intern. Med.* 16: 230-237.

Lybecker, M. C., Samuels, D. S. 2007. Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 64: 1075–1089.

Mosmann, T. R., Coffman, R. L. 1989. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.

Nadelman, R. B., Wormser, G. P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet* 352: 557-565.

Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D. S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F. S., Fikrig, E. 2007. Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog.* 3: 1-11

Nithiuthai, S., Allen, J. R. 1985. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. *Immunology* 55: 157-163.

Nuttall, P. A., Labuda, M. 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129: 177-189.

Nuttall, P. A., Trimnell, A. R., Kazimirova, M., Labuda, M. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28: 155-163.

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

Paine, S. H., Kemp, D. H., Allen, J. R. 1983. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86: 419-428.

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

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

Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., Desilva, A. M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F. S., Telford, S., Anderson, J. F., Fikrig, E. 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119: 457–468.

Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L. K., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Norgard, M. V., Fikrig, E. 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest.* 113: 220-230.

Paveglio, S. A., Allard, J., Mayette, J., Whittaker, L. A., Juncadella, I., Anguita, J., Poynter, M. E. 2007. The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *J. Immunol.* 178: 7064-7071.

Probert, W. S., Kim, J. H., Höök, M., Johnson, B. J. 2001. Mapping the ligand-binding region of *Borrelia burgdorferi* fibronectin-binding protein BBK32. *Infect. Immun.* 69: 4129-4133.

Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E. 2005. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436: 573-577.

Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. S. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86: 9657–9661.

Ribeiro, J. M., Francischetti, I. 2002. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 73-88.

Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. 2007. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J.Immunol.* 179: 1497-1505.

Shen, A. K., Mead, P. S., Beard, C. B. 2011. The Lyme disease vaccine - a public health. *Clin. Infect. Dis.* 52: 247–252.

Schnarr, S., Franz, J. K., Krause, A., Zeidler, H. 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Lyme borreliosis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20: 1099-1118.

Schuijt, T. J., Hovius, J. W., van der Poll, T., van Dam, A. P., Fikrig, E. 2010. Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge and the future. *Trends Parasitol.* 27: 40-47.

Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., Rosa, P. A. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 2909-2913.

Schwan, T. G., Piesman, J. 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* 38: 382-388.

Singh, S. K, Girschick, H. 2003. Tick–host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Current science* 85: 1284-1298.

Singh, S. K., Girschick, H. 2004. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect. Dis.* 4: 575-583.

Soares, C. A., Lima, C. M., Dolan, M. C., Piesman, J., Beard, C. B., Zeidner, N. S. 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the Isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol. Biol.* 14: 443-452.

Ribeiro, J. M., Mather, T. N., Piesman, J., Spielman, A. 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae) . *J. Med. Entomol.* 24: 201-205.

Steere, A. C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D. L., Fikrig, E., Schoen, R. T., Nowakowski, J., Schmid, C. H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D. S. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant Borrelia burgdorferi outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *N. Engl. J. Med.* 339: 209-215.

Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-296.

Stevenson, B., Bono, J. L., Schwan, T. G., Rosa, P. 1998. *Borrelia burgdorferi* erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria. *Infect. Immun.* 66: 2648-2654.

Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K., Rosa, P. A. 2005. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* 53: 1-13.

Takeshita, K., Sakai, K., Bacon, K. B., Gantner, F. 2003. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 1072–1078.

Trimnell, A. R., Davies, G. M., Lissina, O., Hails, R. S., Nuttall, P. A. 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23: 4329-4341.

Tyson, K. R., Elkins, C., de Silva, A. M. 2008. A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *J. Immunol.* 180: 3964-3968.

Ulbrandt, N. D., Cassatt, D. R., Patel, N. K., Roberts, W. C., Bachy, C. M., Fazenbaker, C. A., Hanson, M. S. 2001. Conformational nature of the *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein a epitopes that elicit protective antibodies. *Infect. Immun.* 69: 4799–4807.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. 2000. Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 275: 18717–18723.

Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J., Votýpka, J., Hypša, V., Nohýnková, E., Scholz, T. 2007 Paraziti a jejich biologie. *TRITON*. 260-264.

Yang, X. F., Pal, U., Alani, S. M., Fikrig, E., Norgard, M. V. 2004. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* 199: 641-648.

Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern, L., Piesman, J. 2002. Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysatee enhances spirochaete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* 88: 1276-1278.

Žákovská, A., Čapková, L., Serý, O., Halouzka, J., Dendis, M. 2006. Isolation of *Borrelia afzelii* from overwintering *Culex pipiens* biotype molestus mosquitoes. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13: 345-348.