

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Protinádorové účinky klíštěcích slin a možnosti jejich  
využití v terapii nádorů**

**Bakalářská práce**

**Denisa Foitlová**

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2021

Foitlová, D., 2021: Protinádorové účinky klíštěcích slin a možnosti jejich využití v terapii nádorů. [Anti-tumoral effects of tick saliva and possibilities of their use in tumor therapy, Bc. Thesis, in Czech] – 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

This bachelor thesis discusses tick salivary proteins with antihemostatic, immunomodulatory and anti-tumoral properties. The thesis focuses on tick salivary molecules with anti-tumoral effects and describes the mechanism of their action and possibilities of their use in tumor therapy. In the last chapter, clinical testing of specific anti-tumor molecules and the potential issues of their use in therapy of human tumors are discussed.

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

V Českých Budějovicích, dne 6. 4. 2021

.....  
Denisa Foitlová

## **Poděkování**

Na tomto místě chci poděkovat mému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání velmi zajímavého tématu, za jeho obrovskou trpělivost a ochotu mi vždy poradit a odpovědět na mé dotazy. Dále chci poděkovat mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Klíšťata</b> .....	<b>3</b>
3.1	Rozdělení klíšťat .....	3
3.2	Získávání potravy .....	3
3.3	Životní cyklus .....	4
<b>4</b>	<b>Klíštěcí sliny</b> .....	<b>5</b>
4.1	Slinné žlázy .....	5
4.2	Složení slin .....	6
4.2.1	Glycin- nebo prolin-bohaté, kolagenu podobné proteiny .....	6
4.2.2	Muciny .....	7
4.2.3	Ixodegriny .....	7
4.2.4	Proteiny obsahující Kunitzovu doménu .....	7
4.2.5	Proteiny se serpinovou doménou (serpiny) .....	8
4.2.6	Cystatiny .....	8
4.2.7	Hirudin/Madanin/Variegin rodina .....	9
4.2.8	„Basic tail“ proteiny .....	9
4.2.9	Lipokaliny .....	10
4.2.10	Enzymy .....	11
4.2.11	Proteiny specifické pro Metastriata .....	11
4.2.12	Proteiny specifické pro Prostriata .....	12
<b>5</b>	<b>Vliv klíštěcích slin na hemostázu</b> .....	<b>13</b>
5.1	Vliv na vazokonstrikci .....	13
5.2	Vliv na agregaci trombocytů .....	14
5.3	Vliv na koagulační kaskádu .....	15
<b>6</b>	<b>Vliv klíštěcích slin na imunitní systém</b> .....	<b>16</b>
6.1	Vliv na přirozenou imunitní odpověď .....	16
6.1.1	Vliv na zánětlivou reakci .....	17
6.1.2	Vliv na komplementový systém .....	18
6.2	Vliv na adaptivní imunitní odpověď .....	19

<b>7</b>	<b>Protinádorové účinky klíštěcích slin .....</b>	<b>21</b>
7.1	Vliv klíštěcích slin na různé typy nádorových buněk.....	21
7.2	Konkrétní molekuly s protinádorovým účinkem.....	22
7.2.1	Ixolaris .....	22
7.2.2	Amblyomin X.....	26
7.2.3	RHcyst-1 .....	33
7.2.4	Haemangin.....	34
7.2.5	Longistatin .....	35
7.2.6	HLTnI .....	36
7.2.7	Calreticulin .....	37
<b>8</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Seznam internetových zdrojů .....</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>46</b>

# 1 ÚVOD

Klíšťata jsou krevsající ektoparazité, kteří mají významnou schopnost dlouhodobě sát na svém hostiteli a zůstat přitom bez povšimnutí. Aby toho dosáhla, produkují ve svých slinách širokou škálu biologicky aktivních molekul s antihemostatickými, protizánětlivými a imunomodulačními vlastnostmi. Tyto látky mají významný terapeutický potenciál, díky kterému by mohly být využity k léčbě některých lidských onemocnění. Některé z nich již byly izolovány a testovány na různých zvířecích modelech pro objasnění mechanismu jejich účinku.

Jedním z nejvíce znepokojujících a stále častěji se vyskytujících onemocnění je rakovina. I přes její závažnost jsou současné terapeutické přístupy často nedostatečné nebo vykazují řadu vedlejších účinků, a proto je důležitým cílem výzkumů moderní medicíny izolace molekul s protinádorovými účinky z rostlin a zvířat. Klíšťata jsou velice významným zdrojem farmakologicky aktivních látek a nedávné studie klíštěcích slin prokázaly, že kromě imunosupresivních molekul, které umožňují dlouhodobé sání na hostiteli, mají sliny některých klíšťat pozoruhodný protinádorový potenciál. Mezi dosud identifikované molekuly s protinádorovými účinky, kterým se věnuje tato práce, patří Ixolaris, Amblyomin X, RHcyst-1, Haemangin, Longistatin, HLTnI a Calreticulin.

Objasnění mechanismu působení molekul klíštěcích slin na regulaci buněčných procesů jejich hostitelů by mohlo přinést významné objevy a pokrok v současných, často nedostatečných léčebných metodách.

## **2 CÍLE PRÁCE**

- Vypracovat rešerši na téma protinádorových účinků klíčtčích slin.
- Zhodnotit možnosti využití konkrétních molekul slin k terapii nádorů.
- Diskutovat problematiku použití klíčtčích proteinů k léčbě nádorových onemocnění člověka.

## 3 KLÍŠŤATA

### 3.1 ROZDĚLENÍ KLÍŠŤAT

Klíšťata jsou řád patřící do podtřídy roztočů, třídy pavoukoců, podkmene klepítkatců, kmene členoců (Anderson and Magnarelli, 2008). Jsou rozšířena téměř po celém světě a parazitují na velmi širokém spektru hostitelů zahrnujícím plazi, ptáky, savce a v některých případech i obojživelníky (Sonenshine and Roe, 2014). Zároveň jsou významnými přenašeči velkého množství patogenů (po komárech jsou druzí nejčastější přenašeči lidských patogenů) (Dantas-Torres et al., 2012). Dají se rozdělit do třech hlavních čeledí: Ixodidae (klíšťatovití, 692 druhů), Argasidae (klíšťákovití, 186 druhů) a Nuttalliellidae (pouze 1 druh) (Nava et al., 2009).

Čeď Ixodidae je známá pod názvem tvrdá klíšťata. Tento název je odvozen od jejich charakteristického znaku, jímž je tvrdý sklerotizovaný štítek (scutum) na dorsální straně těla. U dospělých samců kryje téměř celé tělo, u samic pak zasahuje v nenasátém stavu téměř do poloviny či třetiny jejich jinak velmi elastického idiosomatu (Volf a Horák, 2007). Patří mezi ně například rody jako *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* a další (Horak et al., 2002).

Čeď Argasidae je známá pod názvem měkká klíšťata. Tomu odpovídá i jejich tělní pokryv (integument), který je kožovitý. Tvrdý štítek na dorsální straně těla, který je typický pro čeď Ixodidae, jim chybí (Volf a Horák, 2007). Patří mezi ně například rody jako *Argas*, *Ornithodoros* a další (Horak et al., 2002).

Čeď Nuttalliellidae je reprezentována jen jedním druhem a tím je *Nuttalliella namaqua*, který se vyskytuje pouze v jižní Africe a nese znaky jak tvrdých, tak i měkkých klíšťat (Nava et al., 2009).

### 3.2 ZÍSKÁVÁNÍ POTRAVY

Tvrdá a měkká klíšťata se neliší pouze vzhledem a stavbou, ale také strategií při získávání potravy.

Po přisátí setrvávají klíšťata z čeledi Ixodidae na svém hostiteli po delší dobu. Larvy a nymfy sají průměrně 2 až 8 dní, zatímco dospělí jedinci sají 5 až 12 dní. Během prvních 24 hodin přijímají klíšťata malé množství krve a téměř nedochází k růstu jejich hmotnosti. Největší nárůst přichází poslední den, kdy klíště může navýšit svou hmotnost až 100krát. S nárůstem hmotnosti je spojena také tvorba nové kutikuly (Anderson and Magnarelli, 2008). Jejich ukotvení prostřednictvím hypostomu v tkáni hostitele může být u některých druhů podpořeno ještě vyloučením bílkovinné hmoty – tzv. cementu (Volf a Horák, 2007).



Oproti tomu klíšťata z čeledi Argasidae setrvávají přichycena na svém hostiteli celkem krátce. Sát začínají okamžitě, nevyklučují cement a ani netvoří novou kutikulu (Anderson and Magnarelli, 2008). Celý proces sání zabere nanejvýš několik hodin a v některých případech i pouze několik minut, přičemž tělesná hmotnost se zvětšuje 5krát až 10krát (Sauer, 1977). Měkká klíšťata často obývají zvířecí nory a doupata, kde čekají na příležitost přisát se na hostitele. Některé druhy dokážou při tomto čekání hladovět i několik let (Volf a Horák, 2007).

### **3.3 ŽIVOTNÍ CYKLUS**

Všechna klíšťata mají relativně složité vývojové cykly. U čeledi Argasidae zahrnují vajíčko, šestinohou larvu, osminohou nymfu (z ní může být až osm instarů) a nakonec osminohého dospělce. Mezi stádia vývoje čeledi Ixodidae patří vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa a osminozi dospělci. Příjem krve je nutný pro úspěšné dokončení celkového vývoje a pro reprodukci.

Klíšťata můžeme nalézt v úkrytech a doupatech svých hostitelů, pak jsou označována jako nidikolní. Patří mezi ně téměř všechna měkká klíšťata a některé druhy tvrdých klíšťat. Prostředí hnízda poskytuje ideální podmínky pro vývoj mimo hostitele, pro reprodukci a výhodou je i vysoká pravděpodobnost přítomnosti hostitele.

Nalézt je můžeme také ve volné vegetaci, pak jsou to tzv. non-nidikolní klíšťata. Patří mezi ně téměř všechna tvrdá klíšťata osidlující pole, lesy, louky a jiná otevřená prostředí. Druhy, které mezi ně patří, mají často omezenou schopnost vysychání, kterou ale kompenzují pohybem ve vegetaci a schopností absorbovat vlhkost ze vzduchu (Anderson and Magnarelli, 2008).

## 4 KLÍŠTĚCÍ SLINY

### 4.1 SLINNÉ ŽLÁZY

Slinné žlázy klíšťat jsou multifunkční komplexní orgán. Důležitou roli hrají při absorpci vzdušné vlhkosti, při koncentrování živin z krve, při odstraňování přebytečných tekutin, anebo také při produkci cementu, který ukotvuje hypostom v kůži hostitele. Jejich zásadní úlohou je také sekrece biologicky aktivních molekul, které usnadňují příjem krve a přenos patogenů. Jejich fyziologická aktivita a morfologie je spojena s přizpůsobením se parazitickému způsobu života (Šimo et al., 2017).

Slinné žlázy jsou uloženy anteriolaterálně v těle klíšťete. Jedná se o párový orgán, který svým vzhledem připomíná hrozen. Skládají se z jednotlivých oválných váčků (= acinů) spojených slinnými trubicemi, dukty. Dukty lze rozlišit podle jejich velikosti na hlavní, sekundární a lobulární. Sliny, které se vytváří ve slinných žlázách, jsou odváděny slinnými vývody do salivária. To se v těle klíšťete nachází mezi hypostomem a chelicerami (Bowman and Sauer, 2004).

U samic klíšťat z čeledi Argasidae i Ixodidae se slinné žlázy skládají z velkého počtu acinů. U čeledi Ixodidae to jsou tři různé typy (typ I, II a III), u Argasidae to jsou dva různé typy (typ I a II). Kromě toho, u samců čeledi Ixodidae se nachází navíc ještě čtvrtý typ (typ IV). Každý acinus je složen z různých typů buněk a obsahuje různé druhy sekrečních váčků (Binnington, 1978). Podle přítomnosti sekrečních granul lze jednotlivé typy acinů rozdělit na aciny agranulární (typ I) a granulární (typ II, III) (Bowman and Sauer, 2004).

Slinné žlázy klíšťat, kromě jejich role během sání, hrají roli i v metabolismu vody a iontů. U volně žijících klíšťat, jež zrovna nesají na hostiteli, produkují hygroskopický roztok, který je vylučován skrze salivárium na povrch hypostomu. Atmosférická vlhkost je absorbována slanými slinami a je nasávána zpět do těla klíšťete, čímž napomáhá klíšťatům zůstat hydratovaná, někdy i roky, zatímco čekají na hostitele (Bowman and Sauer, 2004; Sauer, 1977).

Během aktivního sání mají slinné žlázy tvrdých klíšťat důležitou funkci při vylučování přebytečných tekutin, protože klíšťata přijímají velké objemy krve. Během sání dochází k návratu až 70 % přebytečné vody a iontů, které se z krve transportují přes střevní epitel do hemocoelu, odkud se vrací zpět přes slinné žlázy do hostitele, zatímco živiny jsou koncentrovány ve střevě. Naproti tomu měkká klíšťata sají přerušovaně menší objemy krve a většinu přebytečné vody odstraňují specializovanými koxálními žlázami (Anderson and Magnarelli, 2008; Bowman and Sauer, 2004).

U tvrdých klíšťat navíc slinné žlázy produkují tzv. cement, který umožňuje pevné ukotvení hypostomu v tkáni hostitele (Bowman et al., 2008). Cement vzniká v acinech typu II a III a skládá se z polymerizovaných a ztužených proteinů bohatých na glycin, z lipidů a sacharidů (Chinery, 1973; Jaworski et al., 1992).

Jakmile je klíště dostatečně nakrmeno, oddělí se od hostitele a žlázy degenerují procesem buněčné apoptózy. Regulace vývoje slinných žláz, degenerace a sekrece tekutin je pod neurohormonální kontrolou (Bowman et al., 2008).

## 4.2 SLOŽENÍ SLIN

Klíštěcí sliny obsahují velké množství proteinů, peptidů a nepeptidických molekul. Tyto látky interferují s obrannými mechanismy hostitele. Mezi ně patří hemostáza, hojení ran a obě větve imunitního systému zahrnující enzymy, cytokiny, komplement, protilátky, buněčnou signalizaci a imunitní buňky. Potlačení obranných reakcí hostitele je zásadní pro přežití a reprodukci klíšťat. Některé biologicky aktivní sloučeniny ve slinách klíšťat mají slibný terapeutický potenciál využitelný pro léčbu některých lidských onemocnění, které souvisejí s poruchami hemostázy a imunitního systému. U slin některých druhů tvrdých klíšťat byly prokázány také cytotoxické a cytolytické aktivity působící proti různým typům buněk. Zahrnují například narušení migrace a signálních drah u rakovinných buněk nebo antiangiogenní mechanismy. To naznačuje, že klíštěcí sliny mohou být důležitým zdrojem pro navrhování nových protinádorových léčiv (Nuttall, 2018; Štibrániová et al., 2019).

Sliny klíšťat obsahují velmi komplexní škálu proteinů, přičemž mnoho proteinů patří do multigenových rodin. U některých rodin se produkce proteinů mění v průběhu sání, takže poslední den sání jsou produkovány jiné proteiny než první den, čímž se klíště může vyhnout imunitní odpovědi hostitele (Francischetti et al., 2009). Některé významné proteinové rodiny a jejich zástupci jsou popsány níže.

### 4.2.1 Glycin- nebo prolin-bohaté, kolagenu podobné proteiny

Do této multigenové rodiny patří proteiny, které se nacházejí v kutikule a matrix slinných žláz. Mohou zajišťovat imunitu klíštěte nebo napodobovat proteiny v hostitelově pokožce (Francischetti et al., 2009). Pro medicínské využití jsou zajímavé proteiny spojené s tvorbou cementu, jímž se tvrdá klíšťata připevňují ke kůži hostitele. Vzhledem k jeho adhezivním a těsnícím vlastnostem byl navržen jako potenciální šablona pro biomimetická tkáňová lepidla (Suppan et al., 2017).

#### 4.2.2 Muciny

Muciny jsou serin- a threonin-bohaté proteiny. Předpokládá se, že jejich funkcí je obalit chitinové části ústního ústrojí klíštěte a tím je ochránit před imunitním systémem hostitele (Francischetti et al., 2009).

#### 4.2.3 Ixodegriny

Patří mezi ně glycin-bohaté proteiny obsahující RGD (arginin-glycin-aspartát) nebo KGD (lysin-glycin-aspartát) motiv. Ixodegriny (také disintegriny) brání vazbě destiček s fibrinogenem a tím inhibují tvorbu krevní sraženiny (Francischetti et al., 2005b). Některé proteiny patřící do rodiny ixodegrinů mohou RGD nebo KGD motiv postrádat, i tak ale mohou plnit funkci disintegrinů (Francischetti et al., 2009).

Významným disintegrinem je **Variabilin** identifikovaný ve slinných žlázách *Dermacentor variabilis*. Variabilin blokuje ADP-indukovanou agregaci krevních destiček a brání vazbě integrinu  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  na imobilizovaný fibrinogen. Je také antagonistou vitronektinového receptoru  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  a brání adhezi buněk osteosarkomu k vitronektinu (Wang et al., 1996).

Dalším zástupcem je např. **Savignygrin** ze slin *Ornithodoros savignyi*, který také působí jako inhibitor trombocytů (Mans et al., 2002).

#### 4.2.4 Proteiny obsahující Kunitzovu doménu

Jedná se o jednu z největších proteinových rodin exprimovaných ve slinách klíšťat. Několik jejích členů bylo funkčně charakterizováno především jako antihemostatická činidla, která blokuje nebo inhibují agregaci krevních destiček a srážení krve hostitele (Corral-Rodríguez et al., 2009).

Intenzivně studovaný je antikoagulační peptid **TAP** (tick anticoagulant peptide), který byl popsán jako přímý inhibitor FXa. Díky jeho specifitě a velikosti (60 aminokyselin) má jistý terapeutický potenciál jako antikoagulant (Waxman et al., 1990).

Mezi další významné členy této rodiny patří např. **Ornithodorin** identifikovaný ve slinách *Ornithodoros moubata*. Obsahuje dvě domény Kunitzova typu a je charakterizován jako inhibitor trombinu (van der Locht et al., 1996).

**TdPI** je glykosylovaný inhibitor Kunitzova typu. Je exprimován pouze první 4 hodiny po přisátí klíštěte a moduluje imunitní obranu hostitele. Také blokuje aktivitu lidských  $\beta$ -tryptáz, jež jsou produkovány žírnými buňkami při tvorbě zánětu (Paesen et al., 2007).

**BmTI-A** je trypsinový inhibitor se dvěma Kunitzovými doménami. Blokuje neutrofilní elastázu, plazmatický kalikrein, trypsin a plazmin. Podle nejnovějších informací také inhibuje angiogenezi *in vitro* (Soares et al., 2016; Tanaka et al., 1999).

**Haemangin** je inhibitor Kunitzova typu identifikovaný ve slinných žlázách klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. Inhibuje trypsin, chymotrypsin a plazmin, čímž podporuje inhibici fibrinolýzy a dokazuje jeho antiproteolytické účinky na angiogenní kaskády. Islam et al. (2009) došli k závěru, že je nezbytný pro přežití klíšťat, a že může být slibným terapeutickým prostředkem v boji proti nemocem přenášeným klíšťaty a také v nádorové angiogenezi.

**Disagregin** je protein získaný ze slin *O. moubata*. Váže se na integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , čímž inhibuje agregaci krevních destiček. Neobsahuje RGD motiv, který se váže na vazebné místo fibrinogenu, a proto může se svou jedinečnou sekvencí a funkcí sloužit k navrhování nových antitrombotik (Karczewski et al., 1994).

Mezi další členy této rodiny patří např. ještě inhibitor kontaktní fáze koagulace **Ir-CPI** nebo **Tryptogalinin** (Decrem, 2009; Valdés et al., 2013).

Velice významné jsou dva proteiny Kunitzova typu – **Ixolaris** a **Amblyomin X**. Jejich podrobnější popis se nachází v samostatné kapitole.

#### 4.2.5 Proteiny se serpinovou doménou (serpiny)

Inhibitory serinových proteáz jsou exprimovány u všech živočichů a mají velice významnou roli při imunitní odpovědi a zánětu. U obratlovců kontrolují srážení krve a u bezobratlých aktivitu profenol-oxidázy, která se účastní imunitních reakcí. Také inhibují faktor Xa (Francischetti et al., 2009).

Prvním identifikovaným klíštěcím serpinem je **Iris**. Iris má imunosupresivní vlastnosti, inhibuje elastázu, blokuje hemostázu obratlovců a inhibuje produkci některých zánětlivých cytokinů a TNF- $\alpha$  (Lebouille et al., 2002; Prevot et al., 2009).

Dalším významným serpinem je **IRS-2**, který inhibuje katepsin G a chymázu (Chmelař et al., 2011). Zároveň také moduluje produkci IL-6 dendritickými buňkami a následnou diferenciaci a zrání Th17 buněk (Páleníková et al., 2015).

#### 4.2.6 Cystatiny

Do této rodiny se řadí inhibitory cysteinových proteáz. Regulují různé biologické procesy obratlovců jako je vývoj imunitní odpovědi, epidermální homeostáza, prezentace antigenu, chemotaxe neutrofilů během zánětu nebo apoptóza. Klíštěcí cystatiny interferují jak s přirozenou, tak s adaptivní imunitou hostitele (Štibrániová et al., 2019).

Funkčně charakterizováno bylo několik klíštěcích cystatinů, z nichž nejvýznamnější jsou **Sialostatin L** a **Sialostatin L2** (Kotsyfakis et al., 2006, 2007). Podrobnější popis jejich působení se nachází v kapitole níže.

Ve slinách *Ixodes ricinus* byl relativně nedávno identifikován cystatin **Iristatin**, který má také imunosupresivní vlastnosti, díky nimž může být užitečný při terapii imunitou zprostředkovaných onemocnění (Kotál et al., 2019).

#### 4.2.7 Hirudin/Madanin/Variegin rodina

Tato rodina zahrnuje převážně malé antitrombiny. Předpokládá se, že se všechny vyskytují pouze u tvrdých metastriátních klíšťat (Francischetti et al., 2009).

**Variegin** je vysoce specifický inhibitor trombinu, který byl nalezen ve slinách *Amblyomma variegatum*. Je homologický k hirudinu a je jedním z nejmenších inhibitorů trombinu, které se v přírodě nacházejí (tvoří ho pouze 32 aminokyselin) (Koh et al., 2011).

Hirudin je peptid objevený ve slinných žlázách pijavice lékařské (*Hirudo medicinalis*). Má silné antikoagulační účinky. Působí jako inhibitor trombinu, kdy brání tvorbě sraženiny, případně sraženinu rozpouští (Fields, 1991).

Iyer et al. (2017) popsali ve slinách klíštěte *A. variegatum* protein podobný varieginu – **Avathrin**, který stejně jako variabilin inhibuje trombin. Proteiny podobné varieginu představují perspektivní kandidáty pro designování nových antikoagulantů pro prevenci arteriální a venózní trombózy během invazivních procedur.

Dalším antitrombinem je **Sculptin** identifikovaný ve slinných žlázách *Amblyomma sculptum*. Sdílí několik podobností s hirudinem, avšak mechanismem inhibice se od sebe mírně liší (Iqbal et al., 2017).

**Madaniny 1, 2** a **Chimadanin** jsou malé, specifické inhibitory trombinu izolované ze slinných žláz *H. longicornis*. Bylo zjištěno, že inhibují trombinem aktivovanou přeměnu fibrinogenu na fibrin, trombinem katalyzovanou aktivaci FV a FVII a trombinem indukovanou agregaci trombocytů (Iwanaga et al., 2003; Nakajima et al., 2006).

V transkriptomu slinných žláz *Hyalomma marginatum rufipes* byl identifikován antitrombin **Hyalomin 1**. Podobně jako madaniny také inhibuje trombinem indukovanou agregaci krevních destiček, trombinem katalyzovanou aktivaci FV a FXI (Jablonka et al., 2015).

#### 4.2.8 „Basic tail“ proteiny

Tato rodina zahrnuje více než sto proteinů primárně nalezených u klíšťat druhu *Ixodes*. Většina z nich obsahuje základní karboxylový konec –COOH (odtud název „basic tail secreted

proteins“ – BTSP). I přes identifikaci některých homologů u metastriátních klíšťat se zdá, že jsou typická pro prostriátní klíšťata (Francischetti et al., 2009). Dosud byly funkčně charakterizovány pouze dva BTSP – antikoagulancia získaná ze slinných žláz *I. scapularis* – **Salp14** a **Ixonnexin**.

Narasimhan et al. (2002) zjistili, že Salp14 narušuje vnitřní dráhu koagulační kaskády a specificky inhibuje FXa. Jiné proteázy ale neinhibuje.

Ixonnexin je slinný protein, který vykazuje homologii se Salp14. Také interaguje s FXa a navíc podporuje fibrinolýzu *in vitro*. V experimentech *in vivo* bylo zjištěno, že inhibuje FeCl<sub>3</sub> indukovanou trombózu u myši a jeví se jako nový modulátor fibrinolýzy, který může být zapojen do studií ischemických příhod, růstu nádorů a metastáz (Assumpção et al., 2018).

#### 4.2.9 Lipokaliny

Lipokaliny jsou všudypřítomné proteiny. Díky jejich struktuře antiparalelního  $\beta$ -barelu s +1 topologií jsou schopné přepravovat malé hydrofobní molekuly. Plní řadu biologických funkcí, včetně regulace buněčné homeostázy a imunitní odpovědi prostřednictvím transportu a skladování malých hydrofobních molekul jako jsou vitaminy, steroidy, histamin, serotonin a prostaglandiny podílející se na modulaci agregace trombocytů, vazokonstrikci a tvorbě zánětu (Schlehuber and Skerra, 2005).

Klíštěcí lipokaliny postrádají tři strukturně konzervované motivy typické pro obecnou rodinu lipokalinů, které jsou zjevně navrženy tak, aby pojaly nabitě hydrofobní ligandy. Na rozdíl od jiných lipokalinů obsahují lipokaliny klíšťat dvě vnitřní vazebná místa H a L, obě pro vazbu histaminu (Paesen et al., 2000). V klíštěcích slinách se nacházejí ve velkém množství. U měkkých klíšťat působí jako antikomplementové faktory (Tambourgi and van den Berg, 2014), inhibitory agregace trombocytů (Keller et al., 1993) a toxiny (Mans et al., 2003). U tvrdých klíšťat vychytávají biogenní aminy, jako je serotonin a histamin (Sangamnatdej et al., 2002) nebo leukotrien B4 (Beaufays et al., 2008a).

**OmCI** (*O. moubata* Complement Inhibitor) izolovaný z měkkého klíštěte *O. moubata* je úplně prvním popsáním inhibitorem komplementu. Inhibuje jeho klasickou i alternativní dráhu. Váže se přímo na C5 složku a zabraňuje její interakci s C5 konvertázou, čímž zabraňuje tvorbě C5a složky a MAC komplexu. Kromě toho také zachycuje zánětlivý mediátor leukotrien B4, silné chemotaktické činidlo a aktivátor neutrofilů (Nunn et al., 2005; Yoshikai, 2001).

Inhibitorem agregace trombocytů je **Moubatin**, lipokalin izolovaný ze slin *O. moubata*, který inhibuje kolagenem zprostředkovanou aktivaci destiček (Waxman and Connolly, 1993).

Sliny tvrdého klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* obsahují dva typy slinných lipokalinů. Jsou strukturně rozlišeny, váží různé ligandy a mají oddělené funkce. Patří mezi ně histamin vázající proteiny **RaHBP-1,2,3** (Paesen et al., 1999) a **Japanin** (Preston et al., 2013). RaHBP-2 má významnou schopnost snižovat zánětlivé reakce, a proto byl navržen pro terapeutické využití. Japanin je N-glykosylovaný lipokalin, který existuje v komplexu s cholesterolem (Roversi et al., 2017). Má schopnost přeprogramovat dendritické buňky, které prezentují antigeny, takže již nereagují na široké spektrum stimulů specifických pro imunitní rozpoznávání (Preston et al., 2013).

**SHBP** (serotonin-histamine binding protein) identifikovaný ve slinách *Dermaacentor reticulatus* je lipokalin, který váže současně serotonin a histamin (Sangamnatdej et al., 2002). Serotonin představuje klíčový neurotransmitter centrální nervové soustavy a podílí se na řadě neurologických poruch (Dinan, 1996). Podobně jako histamin je produkován žírnými buňkami a krevními destičkami. Je také klíčovým mediátorem zánětu (Askenase et al., 1980).

#### 4.2.10 Enzymy

Sliny klíšťat obsahují spoustu enzymů, které napomáhají úspěšnému krmení. Příkladem je **apyráza** (ATP-difosfohydroláza). Je to vápníkem aktivovaný enzym, který blokuje aktivaci trombocytů. Byla nalezena téměř u všech zkoumaných krevsajících členovců, včetně měkkých klíšťat *O. moubata*, *O. savignyi* a tvrdého klíštěte *I. scapularis* (Ribeiro et al., 1985; Ribeiro et al., 1991; Mans et al., 1998a). Kromě toho je také schopna zničit již vzniklý agregát trombocytů odstraněním ADP (Mans et al., 2000).

V klíštěcích slinách se kromě apyrázy vyskytují také esterázy a glukosidázy, fosfolipázy, kinázy a enzymy inaktivující anafylatoxiny (Geczy et al., 1971; Ribeiro and Mather, 1998; Zhu et al., 1998). Dále také **metaloproteázy**, které jsou schopné hydrolyzovat některé složky extracelulární matrix, jako je fibrinogen a fibronectin. Také mohou reagovat s integriny endoteliálních buněk, což může vést k apoptóze a inhibici angiogeneze (Francischetti et al., 2005a).

#### 4.2.11 Proteiny specifické pro Metastriata

Pouze u metastriátních klíšťat bylo dosud identifikováno více než 30 proteinových rodin (Francischetti et al., 2009), ale jen několik z nich bylo funkčně charakterizováno. Patří mezi ně hlavně malé imunoregulační proteiny cílící zejména na cytokiny a chemokiny.

Ve slinných žlázách tvrdého klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum* byly identifikovány dva imunomodulační peptidy, **Hyalomin-A** a **Hyalomin-B**. Oba vykazují významné protizánětlivé a antioxidační aktivity (Wu et al., 2010).



Tian et al. (2016) strukturně a funkčně charakterizovali malý imunosupresivní peptid **Amregulin** ze slin *A. variegatum*. Ten inhibuje *in vitro* sekreci zánětlivých cytokinů a stejně jako hyalominy vykazuje antioxidační aktivitu vychytáváním volných radikálů.

Významnou rodinou jsou evasiny nalezené u klíštěte *Rhipicephalus sanguineus*. Zahrnují tři slinné glykoproteiny – **Evasin-1, -3 a -4**. Jsou vylučovány během krmení a váží se na hostitelské chemokiny, čímž inhibují zánětlivou reakci hostitele (Deruaz et al., 2008; Frauenschuh et al., 2007).

**RaCI** (*R. appendiculatus* C5 inhibitor) byl identifikován v transkriptomu slinných žláz klíštěte *R. appendiculatus*. Jeho sekvence nemá žádnou podobnost s dosud charakterizovanými klíštěcími inhibitory komplementu. RaCI se váže na C5 složku komplementu a blokuje tvorbu C5a a MAC komplexu (Matthijs et al., 2016).

#### 4.2.12 Proteiny specifické pro Prostriata

U klíšťat rodu *Ixodes* bylo identifikováno a charakterizováno několik slinných molekul s antikomplementovými vlastnostmi. Patří mezi ně **Isac a Salp20** u *I. scapularis* (Tyson et al., 2007; Valenzuela et al., 2000), **Irac I, Irac II** (Daix et al., 2007) a **IxACs** u *I. ricinus* (Couvreur et al., 2008). Proteiny Isac a Irac specificky inhibují alternativní cestu komplementu blokováním C3 konvertázy, přičemž tato inhibice může vést k imunosupresi nebo ke snížení opsonizace. Salp 20 a IxACs inhibují alternativní cestu komplementu vazbou na pozitivní regulátor této dráhy, properdin (Couvreur et al., 2008; Hourcade et al., 2016).

**Salp15** je imunosupresivní protein bohatý na cystein. Izolován byl ze slinných žláz *I. scapularis* a jeho účinek spočívá v inhibici aktivace T lymfocytů (Anguita et al., 2002). Díky tomu je slibným kandidátem pro léčbu autoimunitních onemocnění zprostředkovaných T buňkami, jako je např. astma. Kromě CD4+ T lymfocytů ovlivňuje také dendritické buňky a jimi zprostředkovanou produkci zánětlivých cytokinů, což poukazuje na jeho roli při modulaci adaptivních odpovědí imunitního systému (Hovius et al., 2008). Mimo jiné je také prvním prokázaným SAT (saliva assisted transmission) faktorem. Existují důkazy, že *B. burgdorferi* využívá Salp15 během svého přenosu na hostitele. Salp15 specificky interaguje s povrchovým proteinem *B. burgdorferi* OspC, čímž chrání patogen před likvidací protilátkami hostitele (Ramamoorthi et al., 2005).

Ve slinných žlázách *H. longicornis* byl objeven a charakterizován **Longistatin**, vápník vázající protein (Anisuzzaman et al., 2010). Longistatin funguje jako antikoagulant a aktivátor plazminogenu, hydrolyzuje fibrinogen a zpomaluje tvorbu fibrinové sraženiny (Anisuzzaman et al., 2011). Kromě toho také moduluje imunitní reakce hostitele a tvorbu zánětu (Anisuzzaman et al., 2014).

## 5 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HEMOSTÁZU

Hemostáza je velice komplexní a účinný mechanismus, který reguluje ztráty krve při poranění. Zahrnuje tři hlavní procesy: vazokonstrikci, shlukování krevních destiček a koagulační kaskádu. Společně vedou k zástavě krvácení v místě cévního poškození. Každý z těchto tří mechanismů je aktivován několika cestami v reakci na různé exogenní a endogenní stimuly (Chmelař et al., 2012).

Ke stažení cévy, tedy vazokonstrikci, dochází velmi rychle po jejím poškození. Na počátku tohoto děje stojí aktivace trombocytů prostřednictvím mnoha faktorů, jako je např. trombin, kolagen, katepsin G nebo ADP uvolněný z poškozených buněk. Aktivované krevní destičky pak produkují kyselinu arachidonovou, která následně konvertuje na tromboxan A<sub>2</sub>. Produkují také serotonin, který je společně s tromboxanem A<sub>2</sub> zodpovědný za časnou vazokonstrikci. Látky s podobnou funkcí vylučují také žírné buňky (leukotrieny) nebo endotelium (endotelin). V krevním řečišti se pak nachází angiotensin, který je aktivován enzymy a také ovlivňuje vazokonstrikci (Chmelař et al., 2012; Kazimírová and Štibrániová, 2013).

Bezprostředně po cévním poranění dochází k agregaci krevních destiček. Destičky adherují k subendoteliální tkáni, kde jsou aktivovány výše zmíněnými agonisty. Ty se vážou na jejich povrchové receptory a iniciují dlouhý řetězec intracelulárních chemických reakcí, které vedou ke shlukování trombocytů a tvorbě hemostatické zátky, která je následně vyztužena fibrinem vzniklým v koagulační kaskádě (Kazimírová, 2008).

Koagulační kaskáda zahrnuje řadu enzymatických reakcí, kdy je inaktivní proenzym (koagulační faktor) přeměněn na aktivní formu, která potom kaskádovitě aktivuje další inaktivní proenzym (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Může být aktivována exogenní nebo endogenní cestou, jež se následně spojí do cesty společné. Exogenní cesta koagulace začíná poraněním cévy a formací komplexu tkáňového faktoru s aktivovaným faktorem VII. Endogenní cesta začíná aktivací faktoru XII kontaktem s negativně nabitým povrchem. Na konci společné cesty koagulační kaskády je zapojen trombin, který přeměňuje fibrinogen na fibrin (Chmelař et al., 2012).

### 5.1 VLIV NA VAZOKONSTRIKCI

Předpokládá se, že k potlačení vazokonstrikce klíšťata využívají zejména neproteinové složky slin, mezi které patří například prostacyklin a prostaglandiny (Bowman et al., 1996; Ribeiro et al., 1988). Vazodilatační účinky vykazuje také histamin uvolňující faktor (**tHRF**)

sekretovaný ve slinách *I. scapularis* (Dai et al., 2010) a inhibitor serinových proteáz **IRS-2** (*I. ricinus* serpin), který inhibuje katepsin G a chymázu (Chmelař et al., 2011).

## 5.2 VLIV NA AGREGACI TROMBOCYTŮ

Sliny klíšťat dokážou inhibovat agregaci krevních destiček v různých fázích a různými způsoby (Francischetti, 2010). Strategie, kterou volí řada druhů klíšťat (např. *I. scapularis* (Ribeiro et al., 1985) a *O. savignyi* (Mans et al., 1998b)) je cílení na ADP (aktivátor destiček) prostřednictvím enzymu apyrázy. **Apyráza** hydrolyzuje fosfodiesterové vazby v ATP a ADP, čímž vzniká neaktivní AMP.

Mezi další inhibitory agregace destiček patří např. Moubatin. **Moubatin** se váže na tromboxan A<sub>2</sub>, který je zodpovědný za shlukování krevních destiček a časnou vazokonstrikci (Mans and Ribeiro, 2008). Podobným mechanismem účinkuje i inhibitor **Longicornin** přítomný ve slinách *H. longicornis* (Cheng et al., 1999).

Klíčovou roli v sekundární hemostáze hraje trombin. Trombin je serinová proteáza, která na konci koagulační kaskády přeměňuje rozpustný fibrinogen na nerozpustná fibrinová vlákna. Zároveň se také účastní aktivace krevních destiček. Mezi inhibitory trombinu patří např. serpin **IRS-2** z *I. ricinus* (Chmelař et al., 2011) a serpin **IxscS-E1** z *I. scapularis* (Ibelli et al., 2014).

Post-aktivační inhibitory agregace krevních destiček se zaměřují na receptory fibrinogenu. Aktivované destičky exprimují na svém povrchu adhezní receptory známé jako integriny. Integriny jsou proteiny, které zajišťují vazbu buňky na extracelulární matrix nebo k povrchu jiných buněk. Hlavní adhezní molekulou, jež se účastní shlukování krevních destiček, je membránový glykoprotein GP IIb/IIIa (receptor fibrinogenu). Ten se za klidových podmínek vyskytuje v inaktivní formě, až aktivace trombocytů umožňuje jeho vazbu na v plazmě rozpuštěný fibrinogen nebo von Willebrand faktor přes svůj RGD (arginin-glycin-aspartát) motiv. Taková vazba představuje jakýsi můstek mezi dvěma GP IIb/IIIa molekulami přilehlých destiček (Rumbaut and Thiagarajan, 2010). Spousta druhů klíšťat si vyvinula látky, tzv. disintegriny, které obsahují integrinový RGD motiv a brání tak vazbě ostatních ligandů na GP IIa/IIIb, čímž inhibují agregaci destiček (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Patří mezi ně **Savignygrin** (Mans et al., 2002) a **Variabilin** (Wang et al., 1996). Podobným proteinem je i **Ixodegrin** (Francischetti et al., 2005b). Dalším disinteginem je **Disagregin**, který ovšem RGD motiv postrádá, i přes to ale funguje jako antagonist receptoru fibrinogenu (Karczewski et al., 1994).

### 5.3 VLIV NA KOAGULAČNÍ KASKÁDU

Největší skupinou klíštěcích antikoagulant jsou inhibitory serinových proteáz cílící na trombin, FXa a další proteázy iniciační fáze koagulace (Blisnick et al., 2017).

Inhibitory trombinu zahrnují hlavně inhibitory Kunitzova typu. Řadí se mezi ně **Ornithodorin** (van der Locht et al., 1996), **Savignin** (Nienaber et al., 1999), **Boophilin** (Macedo-Ribeiro et al., 2008) a **Rhipilin** (Gao et al., 2011). Dalšími inhibitory trombinu jsou např. **Madanin-1** a **Madanin-2** (Iwanaga et al., 2003), **Variegin** (Koh et al., 2007), **Microphilin** (Ciprandi et al., 2006) nebo **Calcaratin** (Motoyashiki et al., 2003).

Aktivovaný faktor X, který společně s faktorem V tvoří aktivátor protrombinu, je druhým nejčastějším faktorem koagulační kaskády, na který se zaměřují molekuly klíštěcích slin. Antikoagulační peptid **TAP** izolovaný ze slin klíštěte *O. moubata* je zatím nejintenzivněji studovaným antikoagulantem. Vykazuje určitou homologii s inhibitory Kunitzova typu a je vysoce specifickým inhibitorem FXa (Waxman et al., 1990). Mezi další inhibitory FXa se řadí např. **Amblyomin X** (Batista et al., 2010) a **Salp14** (Narasimhan et al., 2002).

Ve slinách *I. scapularis* byly identifikovány dva inhibitory, **Ixolaris** a **Penthalaris**. Tyto proteiny inhibují komplex tkáňového faktoru s aktivovaným faktorem VII (FVIIa/TF), čímž brání aktivaci faktoru X (Francischetti et al., 2002; Francischetti et al., 2004).

Endogenní cesta koagulační kaskády je navázána na systém kalikrein-kinin. Aktivovaný faktor XII katalyzuje přeměnu prekalikreinu na kalikrein, který zpětně napomáhá přeměně neaktivovaného faktoru XII na aktivovaný (Francischetti et al., 2009). Mezi inhibitory vnitřní cesty koagulace patří trypsinový inhibitor **BmTI-A** izolovaný ze slin klíštěte *Boophilus microplus*, který inhibuje právě kalikrein (Tanaka et al., 1999). Dalšími inhibitory jsou např. **Haemaphysalin** (Kato et al., 2005) nebo **Ir-CPI** (coagulation contact phase inhibitor from *I. ricinus*) (Decrem et al., 2009).

Některé složky klíštěcích slin mohou vykazovat fibrinolytickou aktivitu. Příkladem je **metaloproteáza** detekovaná ve slinách *I. scapularis* (Francischetti et al., 2003) nebo **Longistatin**, aktivátor plazminogenu, který vyvolává hydrolýzu fibrinogenu a zpomaluje tvorbu fibrinové sraženiny (Anisuzzaman et al., 2011).

## 6 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém se rozděluje na přirozenou (nespecifickou) a adaptivní (specifickou) imunitu.

Přirozená imunita je založena na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle účinné proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na strukturní či funkční rysy, které jim jsou společné. Buněčné systémy jsou reprezentovány především fagocytujícími a přirozeně cytotoxickými buňkami. Humorální složky vrozené imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Složky vrozené imunity reagují na přítomnost patogenu rychle, řádově v minutách.

Adaptivní imunita je evolučně mladší a zahrnuje antigeně specifické mechanismy reagující na cizorodé struktury prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigeně specifické receptory T lymfocytů). Patří mezi ně mechanismy humorální, založené na protilátkách, a mechanismy buněčně zprostředkované, založené zejména na T lymfocytech. Pro tyto mechanismy je charakteristické, že se spouštějí až po setkání s daným antigenem a pro jejich iniciaci je nezbytná aktivita složek přirozené imunity. Typickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť (Hořejší et al., 2017).

Klíšťata si vyvinula spoustu strategií k modulaci jak přirozené, tak adaptivní imunity, aby se ochránila před zánětlivou a imunitní odpovědí, která by mohla vést k narušení sání a následnému odpadnutí. Molekulární interakce mezi klíštětem a hostitelem jsou považovány za jakousi soutěž mezi obrannými schopnostmi hostitele a snahou ektoparazita těmto schopnostem uniknout (Kazimírová and Štibrániová, 2013). I přes relativně rozsáhlé znalosti imunomodulačních účinků klíštěcích slin bylo doposud identifikováno a charakterizováno pouze skromné množství konkrétních aktivních molekul.

### 6.1 VLIV NA PŘIROZENOU IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Po narušení integrity kůže dochází k okamžité aktivaci procesů potřebných k ničení cizorodých částic a k obnově bariérové funkce pokožky. Látky produkované poškozenými kožními buňkami a mikroby aktivují v místě poškození předem přítomné žírné buňky, makrofágy a dendritické buňky. Žírné buňky následně produkují rozpustné mediátory, jako je bradykinin a histamin, ty pak vyvolávají svědění a bolest. Všechny tři typy zmíněných imunitních buněk produkují chemoatraktanty zahrnující chemokiny a leukotrieny, které rekrutují do místa poškození další imunitní buňky – neutrofile a monocyty. Zároveň také produkují prozánětlivé cytokiny, např. TNF- $\alpha$  a interleukin 1. Monocyty sekretují růstové hormony, které indukují proliferaci fibroblastů a tím napomáhají hojení rány. Aktivované

dendritické buňky rozpoznávají cizí antigeny, migrují lymfatickými cestami do lymfatických uzlin, kde prezentují antigeny naivním T a B lymfocytům, čímž iniciují tvorbu adaptivní imunitní odpovědi, která vrcholí tvorbou antigenně specifických protilátek a T lymfocytů (Šimo et al., 2017).

### 6.1.1 Vliv na zánětlivou reakci

Bradykinin a histamin jsou hlavní mediátory způsobující svědění, bolest a otok. Tím dávají hostiteli povědomí o zranění, což může vést k odstranění klíštěte. Klíšťata proto ve svých slinách sekretují látky, které tyto mediátory inhibují. Příkladem jsou **metaloproteázy** (např. **dipeptidyl karboxypeptidáza**) přítomné ve slinách *I. scapularis* (Ribeiro and Mather, 1998) a *A. maculatum* (Jelinski, 2016), které hydrolyzují bradykinin. Ve slinách *R. appendiculatus* byly popsány dva proteiny vázající histamin – **Ra-HBP(M)** a **Ra-HBP(F)-1,2** (Paesen et al., 1999) a ve slinách *D. reticulatus* serotonin a histamin vázající protein **SHBP** (Sangamnatdej et al., 2002).

V zánětu hrají klíčovou roli neutrofilové. Plní funkci fagocytózy a degradují mikroorganismy ve fagozomech produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a proteáz. Patogeny mohou ničit i bez fagocytózy, a to vylučováním neutrofilních extracelulárních pastí (NETs) a antimikrobiálních peptidů (Amulic et al., 2012). Do místa poranění jsou rekrutovány pomocí chemoatraktantů, mezi které patří např. leukotrien B4, IL-8 a anafylatoxiny (složky komplementu C3a a C5a) (Beaufays et al., 2008a).

Klíšťata si k manipulaci s chemokinovou sítí hostitele vyvinula opět řadu strategií. Ve slinách různých druhů tvrdých klíšťat byla jasně prokázána inhibiční aktivita vůči různým prozánětlivým cytokinům, např. IL-8, MCP-1, eotaxinu, IL-2 a IL-4 (Hajnická et al., 2005). Ve slinných žlázách *R. sanguineus* byly objeveny tři glykoproteiny zvané **Evasiny**. **Evasiny** se řadí do rodiny proteinů vázajících chemokiny a každý jejich konkrétní zástupce (**Evasin-1**, **-3**, **-4**) dokáže vázat odlišný druh chemokinů (Deruaz et al., 2008; Frauenschuh et al., 2007). Chemotaxe neutrofilů interleukinem 8 je inhibována slinnými proteiny **Salp16 Iper1** a **Salp16 Iper2** ze slin *I. persulcatus* (Hidano et al., 2014). Ve slinách klíštěte *H. asiaticum* byly nalezeny dva imunomodulační peptidy **Hyalomin-A** a **Hyalomin-B**. Ty inhibují sekreci zánětlivých faktorů jako je TNF- $\alpha$ , MCP-1 a IFN- $\gamma$ , a naopak zvyšují sekreci imunosupresivního cytokinu IL-10 (Wu et al., 2010). **Amregulin** ze slin *A. variegatum* snižuje produkci TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 a IFN- $\gamma$  *in vitro* (Tian et al., 2016). Protizánětlivou aktivitu ve slinách *I. ricinus* vykazuje lipokalin **Ir-LBP**, který redukuje množství aktivovaných neutrofilů v místě zánětu tím, že specificky váže leukotrien B4 (Beaufays et al., 2008b).

Do zánětlivé odpovědi se zapojují i žírné buňky. Relativně nedávno byl popsán a charakterizován inhibitor proteáz **TdPI** ze slin *R. appendiculatus*, který snižuje aktivitu lidských  $\beta$ -tryptáz, jež mají roli při tvorbě zánětu a reparaci tkání (Paesen et al., 2007).

Také neproteinové molekuly se účastní modulace imunitního systému hostitele. Purinový nukleosid **Ado** (adenosin) a prostaglandin **PGE<sub>2</sub>** ze slin *R. sanguineus* inhibují produkci prozánětlivých cytokinů IL-12p40 a TNF- $\alpha$ , a naopak stimulují produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Oliveira et al., 2011).

Sliny klíšťat omezují i hojení ran a angiogenezi (Hajnická et al., 2011). Angiogeneze je definována jako tvorba nových krevních cév z cév již existujících. Účastní se mimo jiné také vzniku a vývoje nádorů. Molekula podobná troponinu I – **HLTnI** ze slinných žláz *H. longicornis* narušuje proces tvorby nových krevních kapilár inhibicí proliferace endotelových buněk (Fukumoto et al., 2006). Podobný efekt vykazuje i **Haemangin**, protein Kunitzova typu také přítomný ve slinách *H. longicornis* (Islam et al., 2009). Stejně jako předchozí látky dokáží indukovat apoptózu buněk endotelu a tím inhibovat angiogenezi také některé **metaloproteázy**, jak bylo prokázáno ve slinách *I. scapularis* (Francischetti et al., 2005a). Další zajímavou látkou je protein **Ixolaris** ze slin *I. scapularis*, který kromě svých antikoagulačních vlastností také inhibuje vaskulární endotelový růstový faktor a snižuje hustotu cév v nádorech (Carneiro-Lobo et al., 2009).

### 6.1.2 Vliv na komplementový systém

Komplement je kaskáda proteolyticky aktivovaných složek, která nakonec vede ke vzniku pórů ve stěnách mikrobů, což vede k jejich zničení. Existují tři hlavní cesty komplementu: klasická, alternativní a lektinová. Hlavní obranu proti sajícimu klíštěti představuje cesta alternativní. Centrální reakcí ve všech drahách je konverze komplementové složky C3 na C3a a C3b (Aounallah et al., 2020; Rother et al., 1998; Valenzuela et al., 2000).

Ve slinách *I. scapularis* byly identifikovány proteiny **Isac** (*I. scapularis* anti-complement), **Salp20** a **Isac-1** (Tyson et al., 2007; Valenzuela et al., 2000) a ve slinách *I. ricinus* homologní molekuly k proteinu Isac pojmenované **IRAC I** a **II** (*I. ricinus* anti-complement) (Daix et al., 2007). Všechny tyto antikomplementové proteiny blokují navázání faktoru B na C3b složku, čímž zamezují formaci C3 konvertázy.

Protein **OmCI** patřící do rodiny lipokalinů ovlivňuje komplementovou kaskádu tím, že dokáže specificky vázat C5 složku a bránit její aktivaci C5 konvertázou. C3 složku komplementu neovlivňuje (Nunn et al., 2005).

## 6.2 VLIV NA ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Adaptivní imunita se opírá o širokou škálu antigenních receptorů (s měnícími se specifitami rozpoznávání antigenu), které jsou klonálně distribuovány do dvou typů lymfocytů: T a B buněk. Indukce specifické imunitní odpovědi je možná pouze tehdy, když je cizí antigen rozpoznán odpovídajícím receptorem. Tento první rozpoznávací signál je zesílen interakcí kostimulačních molekul na T nebo B buňkách s těmi na APC (antigen prezentujícími buňkami) – jako jsou dendritické buňky nebo makrofágy – patřící do vrozené větve imunitního systému (Medzhitov and Janeway, 1997).

T lymfocyty jsou produkovány v kostní dřeni a diferencují se v brzlíku. Když dozrají, migrují do periferních lymfatických tkání nebo cirkulují v celém těle. Na základě ko-receptorových molekul exprimovaných na povrchu T buněk jsou rozeznávány dvě hlavní subpopulace: CD4<sup>+</sup> (pomocné T buňky) a CD8<sup>+</sup> (cytotoxické T buňky). Na základě sekretovaného cytokinového profilu mohou být CD4<sup>+</sup> T lymfocyty rozděleny do několika subpopulací, přičemž populace Th1 a Th2 jsou dosud nejdůkladněji studovanými populacemi v interakcích klíště-hostitel. Populace Th1 buněk jsou spojeny s buněčnými a zánětlivými reakcemi hostitele, zatímco Th2 populace jsou asociovány s humorálními odpověďmi hostitele (Kara et al., 2014; Kotál et al., 2015; Murphy et al., 2012).

Klíštěcí sliny jsou schopné potlačit iniciaci adaptivní imunity např. tím, že interferují se schopností dendritických buněk prezentovat antigeny T buňkám a tím blokují tvorbu vhodné Th reakce (Cavassani et al., 2005). V některých případech byly tyto aktivity přiřazeny ke konkrétním složkám slin. Bylo prokázáno, že cystatiny – **Sialostatin L** a **Sialostatin L2** ze slin *I. scapularis* inhibují katepsin L. Sialostatin L inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů a maturaci dendritických buněk. Zároveň také inhibuje katepsin S, jež se podílí na zpracování antigenu. Sialostatin L2 nemoduluje funkci antigen prezentujících buněk, ale je zřejmě také důležitý pro úspěšné krmení klíštěte (Kotsyfakis et al., 2006; Sá-Nunes et al., 2009). Oba zmíněné cystatiny působí protizánětlivě (Chmelař et al., 2017). Dalším příkladem je **Japanin**, lipokalin ze slin *R. appendiculatus*, který dokáže přeprogramovat maturaci dendritických buněk, inhibovat jejich proliferaci a diferenciaci z monocytů (Preston et al., 2013).

Ne všechny imunomodulační mediátory klíšťat jsou proteiny. Prostaglandin **PGE<sub>2</sub>** ze slin *I. scapularis* je považován za hlavní inhibitor maturace dendritických buněk. Zároveň také inhibuje TLR ligandem indukovanou sekreci IL-12 a TNF- $\alpha$  (Sá-Nunes et al., 2007).

V řadě studií bylo pozorováno, že klíštěcí sliny zvyšují produkci Th2 signálních cytokinů, jako je např. IL-4, a naopak snižují produkci Th1 prozánětlivých cytokinů, jako je např. IFN- $\gamma$



nebo IL-2 (Ferreira and Silva 1999; Meiri et al., 2001). Slinné inhibitory T lymfocytů zahrnují **protein vázající IL-2** ve slinách *I. scapularis* (Gillespie et al., 2001) a protein **p36** z *D. andersoni* (Bergman et al., 2000), které svými účinky blokují proliferaci T lymfocytů. Proliferaci T buněk negativně ovlivňuje také serpin **Iris** ze slin *I. ricinus*, který ještě navíc indukuje Th2 imunitní odpověď a inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  (Leboulle et al., 2002). Protein **Salp15** ze slin *I. scapularis* inhibuje aktivaci T lymfocytů tím, že se specificky váže na molekuly CD4 na povrchu CD4+ T buněk, což má za následek snížení produkce IL-2 a potlačení jejich proliferace (Anguita et al., 2002; Garg et al., 2006).

B lymfocyty jsou také produkovány v kostní dřeni (Murphy et al., 2012). Jejich další diferenciaci zahrnuje migraci z krevního oběhu do sleziny, kde se vyvíjejí na zralé B lymfocyty, které pak cirkulují mezi lymfatickými uzlinami a slezinou. Jejich základní role spočívá v povrchové expresi a sekreci imunoglobulinů (Carsetti et al., 2004). V imunitě proti klíšťatům produkují B buňky specifické protilátky cílicí na jejich slinné antigeny a v případě vakcinace skrytými antigeny i na antigeny střevních buněk.

Ve slinách klíštěte *H. asiaticum asiaticum* byl nalezen protein pojmenovaný **BIF** (B cell inhibitory factor), který dokáže inhibovat lipopolysacharidem stimulovanou proliferaci B lymfocytů. Molekula se stejnou funkcí byla izolována i ze slin klíštěte *I. ricinus* a byla pojmenována jako **BIP** (B cell inhibitory protein). Obě molekuly zřejmě usnadňují přenos bakterie *Borrelia burgdorferi* na hostitele (Hannier et al., 2004; Yu et al., 2006).

Kromě látek modulujících imunitní odpovědi hostitele produkují některá klíšťata také **proteiny vázající imunoglobulin G** (IgG), které váží hostitelské IgG pozřené během sání a sliněním je navracejí zpět do hostitele. Tento mechanismus chrání klíšťata především před pozřením imunoglobuliny hostitele a usnadňuje jejich krmení (Wang and Nuttall, 1999).

## 7 PROTINÁDOROVÉ ÚČINKY KLÍŠTĚCÍCH SLIN

### 7.1 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA RŮZNÉ TYPY NÁDOROVÝCH BUNĚK

Jedním z prvních důkazů protinádorových účinků klíštěcích slin je studie slin čtyř druhů tvrdých klíšťat (včetně *I. ricinus*), kdy SGE (salivary gland extract) potlačoval proliferaci buněk HeLa. Bylo prokázáno, že SGE klíšťat mohou obsahovat různé látky, které potlačují buněčnou proliferaci a vyvolávají apoptózu. Během experimentu část buněk hynula apoptózou, avšak z větší části se jednalo o inhibici proliferace závislé na dávce SGE. Aktivní sloučenina zodpovědná za tuto aktivitu byla s největší pravděpodobností protein, jelikož po inkubaci SGE při 100 ° C již antiproliferativní účinky pozorovány nebyly (Kazimírová et al., 2006).

U slin několika dalších druhů klíšťat byl prokázán specifický účinek na nádorové buňky, přičemž nenádorové (netransformované) buňky nebyly ovlivněny. Sousa et al. (2018) provedli experiment, při němž sliny z *A. sculptum*, *A. parvum* a *R. sanguineus* prokázaly cytotoxický efekt na dvě nádorové linie prsu, ale ne na nenádorovou linii MCF-10A. Nádorové buňky hynuly na apoptózu indukovanou aktivitou kaspázy 3 a 7. Zároveň také sliny působily morfologické změny nádorových buněk, kdy bylo pozorovatelné jejich zakulacení. Tyto změny nebyly pozorovány v buňkách MFC-10A, které zůstaly téměř nezměněny i po expozici různým typům slin z různých klíšťat. Biologický význam této selektivní aktivity slin je ale nejasný. Podobné výsledky získali i Simons et al. (2011), kteří hodnotili účinky slin z *A. cajennense* na různé typy nádorů. Pozorovali, že sliny měly cytotoxický efekt na buňky pankreatického adenokarcinomu a na buňky lidského melanomu, avšak u lidských fibroblastů žádný efekt pozorován nebyl. Cytotoxický účinek byl tedy specifický pro nádorové linie. U nádorových buněk byla pozorována fragmentace DNA a morfologické změny, ale šlo o regulovaný proces s charakteristikami nekrózy – hovoří se o nekroptóze.

Prokázán byl také antiangiogenní účinek klíštěcích slin, což souvisí s výskytem metastáz. Metastáza je proces, při kterém se rakovinné buňky šíří z primárního nádoru do vzdálenějších míst, kde vytvářejí sekundární nádory. Klíčová je při tom jejich motilita (Price et al., 1997). Normální migrace buněk je vícestupňový proces regulovaný přenosem signálu. Stejně signální proteiny, které využívají normální buňky k migraci, využívají také rakovinné buňky ke zvýšení jejich pohyblivosti. Migrační aktivita rakovinných buněk může být regulována receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR) a složkami vázajícími se na tyto receptory, jako je extracelulárně regulovaná kináza (ERK) a proteinkináza B (Gan et al., 2010). U klíštěte *D. variabilis* byl testován vliv slin na migraci a invazivitu osteosarkomové linie Saos-2

a buněk nádoru prsu. V buňkách Saos-2 sliny potlačovaly aktivaci proteinkinázy B pomocí epidermálního růstového faktoru (EGF). Inhibice migrace byla prokázána přes matrigelem pokrytý filtr. Matrigel je želatinová směs proteinů, která svým složením připomíná extracelulární matrix, a která stimuluje buňky k produkci proteáz (Poole et al., 2013).

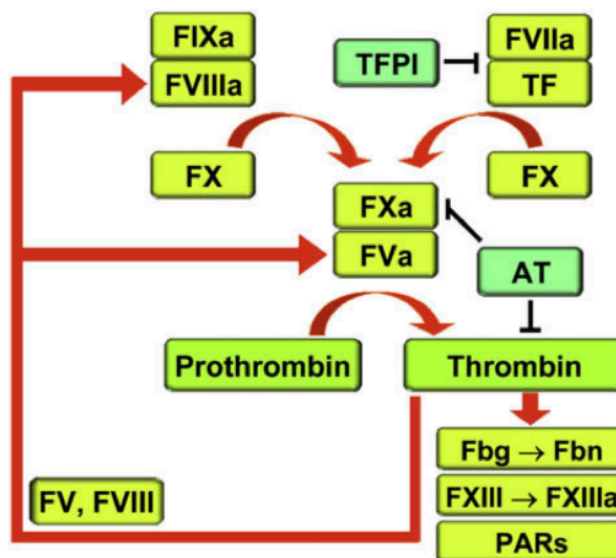
Angiogeneze je definována jako tvorba nových krevních kapilár z již existujících krevních cév. Jsou za ni zodpovědné endotelové buňky, které migrují do sousedních tkání. Je důležitá v různých fyziologických procesech a je obzvláště významná v pozdních stádiích hojení ran. Hojení je klíčovým krokem při reparaci poškozených tkání, a je rozděleno do tří fází: zánětu, proliferace a remodelace. Je zajímavé, že k angiogenezi dochází většinou během proliferativní fáze, kdy dochází k tvorbě tzv. granulační tkáně. Ta je charakterizována intenzivní proliferací endotelových buněk, akumulací fibroblastů a syntézou kolagenu – poskytuje živiny, kyslík a fyzickou oporu pro růst tkáně (Stappenbeck and Miyoshi, 2009). Za maligních podmínek (např. během neoplastických procesů) dochází k narušení rovnováhy mezi proangiogenními a antiangiogenními faktory. Tento proces se nazývá „angiogenní přepínač“ a je řízen zvýšeným přísunem živin nezbytných pro růst nádoru (Rieger and Welter, 2015). V souvislosti s tím byly ve slinách klíšťať pozorovány dvě biologické aktivity – inhibice proliferace a angiogeneze endotelových buněk. Bylo zjištěno, že klíšťecí sliny tlumí angiogenezi nejméně dvěma způsoby: blokováním integrinové funkce endotelových buněk vedoucí k buněčné apoptóze a degradací provizorní matrix. Oba tyto mechanismy zabraňují tvorbě granulační tkáně, což vede k inhibici hojení a reparace tkání. Díky tomu se klíšťata mohou úspěšně krmit po celé dny (Francischetti et al., 2005a). SGE z klíšťete *Hyalomma dromedarii* také prokazatelně inhibuje angiogenezi a má protinádorové vlastnosti. V pokusech blokoval adhezi a migraci lidských endoteliálních buněk z pupečnickové žíly (HUVECs) a angiogenezi na modelu kuřecí chorioalantoidní membrány. Kromě toho měl také antiproliferativní účinek na glioblastomové buňky U87 a inhiboval jejich migraci a adhezi k fibrinogenu (Bensaoud et al., 2017).

## **7.2 KONKRÉTNÍ MOLEKULY S PROTINÁDOROVÝM ÚČINKEM**

### **7.2.1 Ixolaris**

Ixolaris, protein o velikosti 15,7 kDa, byl poprvé izolován ze slin tvrdého klíšťete *I. scapularis*. Jeho molekulu tvoří celkem 140 aminokyselin zahrnujících 10 cysteinů a 2 domény Kunitzova typu. Analýzou jeho cDNA byla nalezena sekvenční homologie s lidským inhibitorem tkáňového faktoru TFPI (tissue factor pathway inhibitor).

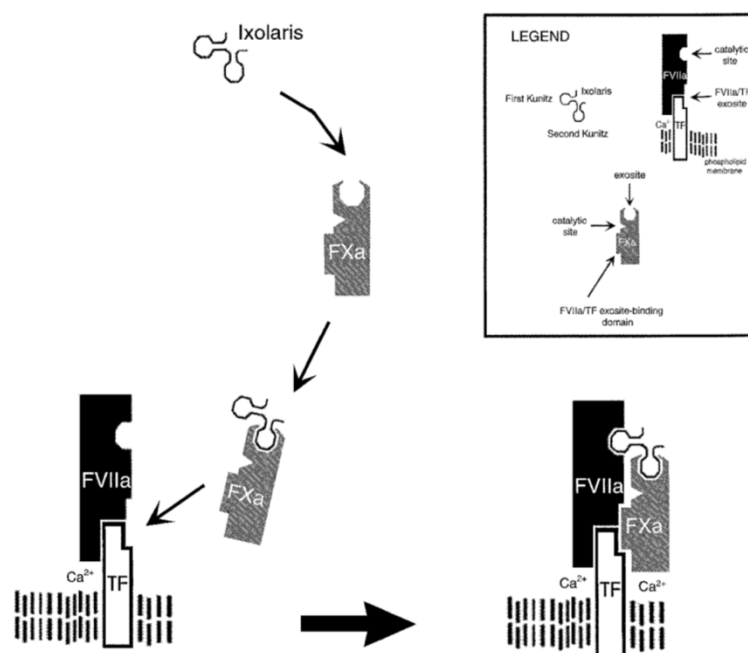
Bylo zjištěno, že Ixolaris ovlivňuje koagulační kaskádu hostitele inhibicí komplexu FVIIa/TF, čímž brání přeměně faktoru X (FX) na jeho aktivovanou formu Xa (FXa). Po poranění tkáně je zásadním krokem pro aktivaci vnější koagulační kaskády uvolnění tkáňového faktoru (TF). TF se váže na koagulační faktor VIIa a vzniklý komplex FVIIa/TF pak aktivuje FX na FXa, což vede k tvorbě trombinu a fibrinu. Zahájení srážení krve je pak pod kontrolou TFPI (Francischetti et al., 2002).



**Obr. 1:** Zjednodušené schéma koagulační kaskády (Corral-Rodríguez et al., 2009).

Rozdíl mezi lidským TFPI a proteinem Ixolaris je ve vazbě na FXa. TFPI se váže na aktivní centrum FXa, zatímco Ixolaris se váže na vedlejší vazebné místo pro heparin (heparin-binding exosite, HBE) (Nazareth et al., 2006). Dalším rozdílem je také schopnost proteinu Ixolaris interagovat se zymogenem FX, a to pravděpodobně prostřednictvím prekursoru vedlejšího vazebného místa pro heparin (proexosite HBPE) (Monteiro et al., 2008).

Funkce proteinu Ixolaris spočívá ve vazbě na jakési lešení, které představuje zymogen (proenzym) FX nebo jeho aktivovaná forma FXa. Tato vazba zapřičiňuje zformování pevného komplexu FVIIa/TF/Ixolaris/FX(a), ve kterém je aktivní místo faktoru VIIa proteinem Ixolaris inaktivované. Schopnost vázat se jak k FX, tak k FXa je velice efektivní, jelikož umožňuje komplexu Ixolaris/FX inhibovat FVIIa/TF *in vivo* nezávisle na produkci FXa (Francischetti et al., 2002). Kromě toho dokáže Ixolaris také účinně narušit aktivaci FX komplexem FVIIIa/FIXa (vnitřní tenáza) *in vitro*, a to blokováním jeho vazby na FVIIIa (Monteiro et al., 2008). Navíc se zdá, že Ixolaris přímo inhibuje tvorbu trombinu tím, že soutěží s protrombinem o vazbu na vedlejší vazebné místo pro heparin FXa, čímž brání formování komplexu FVa/FXa (protrombináza) (Monteiro et al., 2005).



**Obr. 2: Mechanismus působení proteinu Ixolaris** (Francischetti et al., 2002).

Jak již bylo zmíněno, při poranění stěny cévy je uvolněn membránově vázaný tkáňový faktor a je zahájeno srážení krve (Gomez and McVey, 2006). Abnormální exprese TF byla zdokumentována u několika typů nádorů, včetně velmi agresivních typů (např. glioblastom) a zdá se, že s agresivním chováním tumoru přímo koreluje. Exprese TF koreluje zejména s nevyváženou produkcí anti- a/nebo proangiogenních faktorů, mezi které patří např. vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), klíčový mediátor angiogeneze, který zvyšuje vaskularizaci tumoru (Abe et al., 1999). TF podporuje progresi tumoru nejen aktivací koagulace, ale i přímou signalizací. TF a další enzymy koagulační kaskády jsou rozeznávány proteázou aktivovanými receptory (PARs). V případě nádorových buněk vede aktivace PARs k proliferaci, migraci, inhibici apoptózy, vzniku metastáz a k produkci faktorů podporujících agresivitu nádoru. Mezi ně patří např. již zmíněný VEGF, IL-8, metaloproteázy a další (Rao and Pendurthi, 2005). To vše poukazuje na roli TF při progresi tohoto onemocnění a naznačuje možnost využití antikoagulant pro léčbu rakoviny (Carneiro-Lobo et al., 2009).

Předpoklad, že protein Ixolaris může interferovat s progresí glioblastomu díky jeho silným antikoagulačním vlastnostem, byl potvrzen. V experimentu Ixolaris inhiboval tumorogenní potenciál glioblastomových buněk u nemocných myši. Spolu s inhibicí růstu nádoru způsobil downregulaci VEGF a redukoval tak vaskularizaci nádoru (Carneiro-Lobo et al., 2009). Podání proteinu Ixolaris mělo podobný efekt i v případě myšního melanomu. Melanom je vysoce metastazující typ tumoru a existuje mnoho důkazů, že TF přispívá k jeho agresivnímu chování. V pokusu Ixolaris úspěšně blokoval metastázy myši melanomové linie

B16F10 *in vivo* a snížil jejich počet v plicích ze 47 na 4. Zároveň měl přímý cytotoxický efekt na melanomové buňky *in vitro*. Imunohistochemické analýzy ukázaly, že inhibice růstu melanomu byla opět doprovázena jak downregulací exprese VEGF, tak vaskularizace nádoru (de Oliveira et al., 2012). I přes to, že je poločas rozpadu tohoto proteinu relativně dlouhý (< 24 hodin), jeho opakované podání nemělo ani v jednom případě za následek krvácení, které hrozí jako vedlejší účinek při léčbě antikoagulanty. Tyto výsledky naznačují, že Ixolaris patří mezi slibné kandidáty pro vývoj nových protinádorových léčiv (Carneiro-Lobo et al., 2009; de Oliveira et al., 2012).

Na modelu rakoviny prsu bylo prokázáno, že vyšší koncentrace proteinu Ixolaris dokáže přímo inhibovat signalizaci PAR2 zprostředkovanou komplexem FVIIa/TF. Dochází k tomu nezávisle na přítomnosti FX(a), který zvyšuje afinitu proteinu Ixolaris ke komplexu FVIIa/TF. Místo, kde se Ixolaris váže na FVIIa, se totiž překrývá s místem, kde FVIIa váže PAR2. Ixolaris tedy může blokovat růst nádorů s ektopickou expresí FVIIa prostřednictvím inhibice FVIIa/TF/PAR2 signalizace (Carneiro-Lobo et al., 2012).

Zásadní roli v diagnostice a terapii nádorových onemocnění hraje molekulární zobrazování (Jarzabek et al., 2013). V této souvislosti byl TF označen jako potenciální cíl, který lze využít k zobrazení agresivních nádorů. Po navázání proteinu Ixolaris na izotop technecia ( $^{99}\text{Tc}$ ) byl rozpoznáván TF, který je v případě glioblastomu zvýšeně produkován astrocyty. Použití radiofarmaka  $^{99}\text{Tc}$ -Ixolaris by tedy díky tomu mohlo sloužit ke kvantifikaci TF a k identifikaci specifické skupiny pacientů, které by mohla prospívat léčba zaměřená proti TF (Barboza et al., 2015). I v případě navázání proteinu Ixolaris na radioizotop jódu ( $^{131}\text{I}$ ) byly pozorovány pozitivní účinky. Při experimentální léčbě myšího melanomu došlo po podání radiofarmaka  $^{131}\text{I}$ -Ixolaris k významnému snížení počtu plicních metastáz, k čemuž při léčbě samotným radioizotopem  $^{131}\text{I}$  nedošlo. Celkové výsledky prokázaly schopnost  $^{131}\text{I}$ -Ixolaris rozpoznat nádory exprimující TF. Proto bylo toto radiofarmakum navrženo pro léčbu diseminovaných tumorů, u kterých jsou možnosti terapie poměrně omezené. Ixolaris tedy může najít své využití v radionuklidové terapii (RTT) (Barboza et al., 2020).

Abnormální produkce TF je pozorována i v případě infekce virem HIV. Jako odpověď na stimulaci Toll-like receptorů (TLR) exprimuje určitá podskupina monocytů v rámci patogeneze tohoto onemocnění zvýšené hladiny TF. Tím dochází k aktivaci FX, iniciaci koagulační kaskády a tvorbě fibrinu a trombinu. Degradaci těchto faktorů dochází ke vzniku koagulačních markerů, D-dimerů. Stejná podskupina monocytů zároveň produkuje zánětlivé cytokiny, jako je např. IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ . Díky tomu hrozí pacientům s HIV vyšší riziko vzniku neinfekčních chronických komplikací, jako jsou kardiovaskulární nebo

tromboembolická onemocnění. V experimentu bylo po podání proteinu Ixolaris pozorováno snížení funkční aktivity TF, aniž by byla ovlivněna odpověď monocytů na stimulaci TLR. Zároveň bylo *in vivo* ošetření spojeno s významným poklesem hladiny D-dimerů a imunitní aktivace. To naznačuje, že monocyty produkující TF se nacházejí v epicentru zánětu a koagulace u chronické infekce HIV, a že mohou představovat potenciální terapeutický cíl (Schechter et al., 2017).

### 7.2.2 Amblyomin X

Amblyomin X (*Amblyomma* Factor Xa inhibitor) je rekombinantní protein Kunitzova typu o velikosti asi 13,5 kDa, který byl poprvé identifikován ve slinných žlázách klíštěte *A. cajennense* (*A. sculptum*). Je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem se sedmi cysteinovými zbytky. Analýzou jeho struktury bylo prokázáno, že vykazuje částečnou sekvenční podobnost s lidským TFPI a proteinem Ixolaris (Batista et al., 2010). Řadí se mezi inhibitory serinových proteáz a vykazuje mnoho biologických aktivit. Je schopen inhibovat koagulační faktor Xa, aktivitu protrombinázy a tenázy (Branco et al., 2016). Mimo jiné existují mnohé důkazy o jeho cytotoxických a protinádorových účincích.

Protinádorová aktivita Amblyominu X byla poprvé prokázána na modelu myšího melanomu B16F10, kdy jasně indukoval regresi objemu nádoru a snížení počtu metastáz až o 60 %. Zároveň také vykazoval proapoptotickou aktivitu na buněčných liniích melanomu a pankreatického adenokarcinomu, ale na netransformované fibroblasty žádný efekt neměl. Protože apoptóza je způsob, jak eliminovat abnormální buňky bez aktivace imunitního systému, jsou při léčbě nádorů obzvláště výhodné látky, které apoptózu v nádorových buňkách selektivně podporují. Ošetření obou typů zmíněných nádorových linií proteinem Amblyomin X vedlo ke změnám exprese řady genů, přičemž jen některé změny byly společné oběma. Jednalo se například o zvýšenou expresi genu kódující  $\beta 2$  podjednotku proteazomu. 20S proteazom obsahuje aktivní místa s aktivitou podobnou kaspázám, trypsinu a chymotrypsinu. Podání Amblyominu X způsobilo ztrátu proteazomální aktivity podobné trypsinu, čímž se odlišuje od běžných proapoptotických inhibitorů proteazomu, které přednostně inhibují aktivitu podobnou chymotrypsinu. Aktivita podobná trypsinu je s největší pravděpodobností spojena se specifickou regulací buněčného cyklu, včetně apoptotické odpovědi. Celkové výsledky této studie ukázaly, že léčba Amblyominem X modifikuje ubiquitin-proteázový systém a tím způsobuje smrt nádorových buněk prostřednictvím apoptózy (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Renální karcinom patří mezi nejčastější nádory ledvin. Vzhledem k jeho vysoké rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii je jedním z nejobtížněji léčitelných urologických

novotvarů. Proto je třeba neustále zkoumat nové možnosti léčby, které přinesou efektivní výsledky a neponesou s sebou řadu vedlejších účinků. Amblyomin X byl díky svým proapoptotickým vlastnostem vybrán jako potenciální kandidát (Akagi et al., 2012).

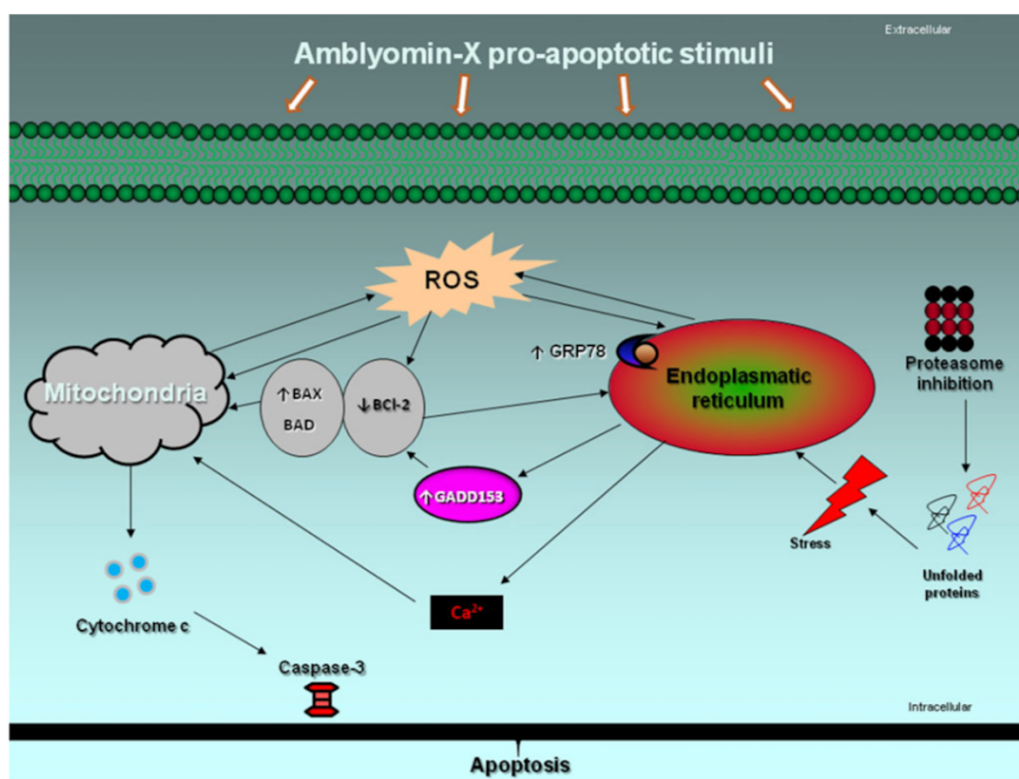
Apoptóza je přísně regulovaný mechanismus buněčné smrti, při kterém je aktivováno mnoho katabolických enzymů, zejména proteáz a nukleáz. To vede k řadě biochemických a morfologických změn, které vrcholí buněčným kolapsem. Tento proces buněčné smrti hraje zásadní roli při udržování homeostázy tkání a je důležitý i za určitých patologických stavů, včetně rakoviny. Mezi první morfologické charakteristiky apoptózy patří tvorba váčkovitých výrůstků z membrány (tzv. blebbing), smršťování buněk, přeskupení cytoskeletu, kondenzace chromatinu a fragmentace jader. Celý proces končí rozpadem buňky do apoptotických tělísek, což jsou membránou ohraničené buněčné fragmenty, které jsou fagocytovány tkáňovými makrofágy. Signálem pro fagocytózu je translokace fosfatidylserinu na vnější povrch membrány (Fadok et al., 1992; Israels and Israels, 1999).

Po podání Amblyominu X vykazovaly buňky myšího renálního karcinomu (RENCA) výše zmíněné morfologické změny svědčící o probíhající apoptóze. Pozorována byla významná ztráta životaschopnosti, což potvrdilo silný cytotoxický efekt. U normálních buněk žádné změny pozorovány nebyly (Akagi et al., 2012).

Amblyomin X indukuje apoptózu v buňkách myšího renálního karcinomu několika způsoby: nerovnováhou mezi proapoptotickými a protiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2, mitochondriální dysfunkcí, produkcí ROS, aktivací kaspázové kaskády, inhibicí proteazomu a stresem endoplazmatického retikula (Maria et al., 2013). Proteiny rodiny Bcl-2 se nacházejí na vnější mitochondriální membráně. Protiapoptotické proteiny tuto membránu stabilizují, zatímco ty proapoptotické stimuluji uvolňování cytochromu c, což vede k přerušení elektronového transportního řetězce, produkci ROS a aktivaci kaspázové kaskády vedoucí k apoptóze (Soriano and Scorrano, 2010). Inhibicí proteazomální aktivity způsobuje Amblyomin X stres endoplazmatického retikula (ER), který také vede k apoptóze (Maria et al., 2013). ER je buněčná organela, která se účastní syntézy, strukturální modifikace a transportu proteinů a lipidů (Deniaud et al., 2008). Pokud jsou nově syntetizované proteiny špatně poskládány, jsou retro-translokovány do cytosolu, kde jsou okamžitě směřovány k proteazomální degradaci (Tsai et al., 2002). Blokování proteolytické funkce proteazomu může způsobit hromadění chybně poskládaných proteinů v ER a narušit tak jeho homeostázu. V důsledku stresu ER pak dochází ke zvyšování koncentrace volných intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Za těchto podmínek se aktivují signální dráhy, tzv. UPR (unfolded protein response), které navracejí ER zpět do jeho normálního fyziologického stavu. Snižují syntézu

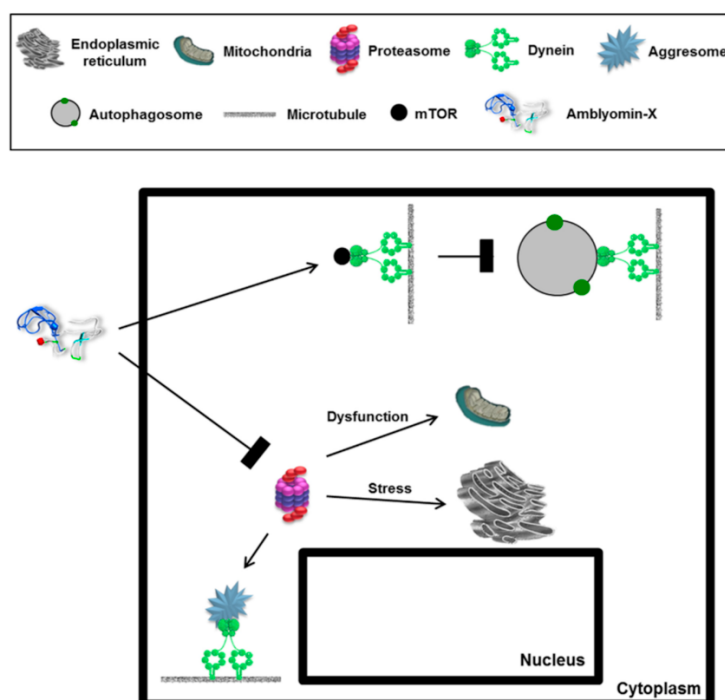


nových proteinů a zvyšují transkripci genů kódujících chaperony a komponenty ER associated degradation (ERAD). ERAD je proteolytická dráha, ve které jsou nesbalené proteiny z ER aktivně přenášeny do cytoplazmy a označeny ubiquitinem pro degradaci ve 26S proteasomu (Jarosch et al., 2003; Schröder and Kaufman, 2005). Pokud je však inhibice proteasomu trvalá a stres ER přetrvává, buňka přepne z UPR signalizace na apoptotickou dráhu. Apoptóza vyvolaná stresem ER je zprostředkována vnitřní mitochondriální dráhou, které se účastní proteiny rodiny Bcl-2 a specifické kaspázy. U buněk RENCA byl tento proces sledován po ošetření Amblyominem X. Po 24 hodinách inkubace došlo ke zvýšení exprese chaperonu GRP78 (glucose-regulated protein) a transkripčního faktoru GADD153. GADD153 potlačuje promotory Bcl-2 a je schopen zvýšit citlivost mitochondrií na podněty proapoptotických členů proteinové rodiny Bcl-2 Bax a Bad (Maria et al., 2013). Podobný mechanismus byl popsán i v experimentu s nádorovými liniemi melanomu a pankreatického adenokarcinomu. Amblyomin X navíc opět působil cytotoxicky pouze na rakovinné buňky, ale na lidské fibroblasty žádný efekt neměl. K účinkům Amblyominu X byly citlivé i nádorové buňky rezistentní k léčivu bortezomib, jež byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu refrakterního mnohočetného myelomu. Bortezomib je inhibitor proteasomu, který cílí na jeho  $\beta 5$  podjednotku s aktivitou podobnou chymotrypsinu (Morais et al., 2016).



Obr. 3: Proapoptotické mechanismy působení Amblyominu X v buňkách RENCA (Maria et al., 2013).

Microarray analýzy poskytly kromě proteazomu také druhý možný cíl Amblyominu X, a to skupinu proteinů označovanou jako dynein. Dynein je molekulární motor, který hraje klíčovou roli v intracelulárním transportu. Podílí se na transportu buněčných komponent jako jsou endosomy, agresomy, Golgiho aparát, ER a další. Transportuje i transkripční faktory a proteiny (Pacheco et al., 2016). Inhibice proteazomu indukuje agregaci proteinů, které jsou strukturovány do dynamických vezikul, tzv. agresomů, a aktivuje autofagickou odpověď za účelem jejich degradace (Garcia-Mata et al., 2002). V tomto ohledu byla zkoumána role dyneinu ve dráze proteazom–agresom–autofagie u nádorových buněk ošetřených Amblyominem X. Tento rekombinantní protein vyvolal tvorbu a transport agresomů prostřednictvím neexkluzivní ubiquitinové dráhy, která je zprostředkována přenosem chaperonu Hsp70 na molekulu Bag3. Na rozdíl od dosud dostupných inhibitorů proteazomu přítomnost Amblyominu X inhibovala autofagii a bylo navrženo, že k inhibici dochází aktivací signální cesty mTOR za pomoci dyneinu. Role dyneinu v mechanismu účinku Amblyominu X tedy souvisí s tvorbou agresomů a inhibicí autofagie. Přesná funkce dyneinu při příjmu a transportu tohoto proteinu je však stále předmětem zkoumání (Pacheco et al., 2016).



**Obr. 4: Mechanismus účinku Amblyominu X *in vitro*.** Amblyomin X inhibuje aktivitu proteazomu, čímž indukuje: stres ER, mitochondriální dysfunkci a tvorbu agresomů, které jsou transportovány dyneinem. Amblyomin X zároveň podporuje inhibici autofagie skrze aktivaci signální kaskády mTOR za pomoci dyneinu. Proto nedochází k degradaci agresomů. Tyto faktory jsou rozhodující pro indukci apoptózy (Chudzinski-Tavassi et al., 2016).

Vliv Amblyominu X na proliferaci nádorových buněk hodnotili de Souza et al. (2016) na myších buňkách RENCA *in vitro*. Po ošetření tímto proteinem analýzy indexu buněčné proliferace prokázaly, že došlo k významnému snížení. Tento efekt byl navíc doprovázen zastavením buněčného cyklu. Taková buněčná odpověď mohla souviset s inhibicí proteazomu a stresem ER, jak je zmíněno výše. Proteazom je důležitý pro modulaci cyklin-dependentních inhibitorů p21 a p27, a proto mohou změny jeho aktivity vést k poruchám buněčného cyklu (Lu and Hunter, 2010). Stres ER byl v buňkách RENCA doprovázen indukcí exprese transkripčního faktoru GADD153, což také může vést k zastavení buněčného cyklu (Faitová et al., 2006). S ohledem na tato zjištění byly hodnoceny také hladiny biomarkerů buněčné proliferace. Ošetření Amblyominem X snížilo v buňkách RENCA hladinu proteinu Ki67 a cyklinu D1. Oproti tomu u nenádorových buněk bylo pozorováno pouze nepatrné snížení exprese cyklinu D1. Tento regulační protein je zapojen do přechodu buňky z fáze G1 do fáze S a lze jej považovat za indikátor proliferativní reakce (de Souza et al., 2016).

K dalším protinádorovým vlastnostem Amblyominu X patří také jeho antiangiogenní účinky. Angiogeneze je velice komplexní patofyziologický proces, při kterém již existující endoteliální buňky degradují bazální membránu, migrují a proliferují do stromatu sousedních tkání v reakci na různé angiogenní faktory. Drewes et al. (2012) prokázali, že Amblyomin X inhibuje VEGF-A indukovanou angiogenezi u myší a na modelu kuřecí chorioalantoidní membrány. VEGF-A interaguje s receptory vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGFR 1 a 2) na buněčných membránách a spouští intracelulární mechanismy vedoucí k angiogenezi. Indukuje endoteliální permeabilitu, proliferaci, migraci a adhezi (Shibuya, 2014). Při experimentu Amblyomin X také významně zpomaloval buněčný cyklus udržováním buněk v G0/G1 fázi a inhiboval adhezi a proliferaci endoteliálních buněk tím, že blokoval expresi molekuly PECAM-1. PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule) patří mezi molekuly podílející se na angiogenezi a v případě nádorových buněk zprostředkovává jejich proliferaci a vazbu na mikrovaskulární síť (Drewes et al., 2012).

V souboru *in vivo* a *in vitro* testů byly popsány molekulární mechanismy působení Amblyominu X na funkce endoteliálních buněk během angiogeneze. Data jasně prokázala, že je schopen modifikovat jejich posttranskripční mechanismy. Po ošetření myší tímto proteinem bylo pozorováno významné snížení vaskularizace, ale nebyly pozorovány žádné lokální změny vaskulární permeability. To naznačuje, že tento protein nepůsobí přímo na endoteliální kontraktilní mechanismy. Podání Amblyominu X nijak neovlivnilo produkci NO a PGE<sub>2</sub>, důležitých induktorů vaskulární permeability. Post-transkripčním mechanismem ovšem došlo ke snížení sekrece VEGF-A. Přestože je VEGF-A také významným zesilovačem vaskulární

permeability, kombinace dalších endogenních vaskulárních faktorů, jako je histamin, serotonin, PGE<sub>2</sub> a NO zřejmě zodpovídala za nezměněnou vaskulární permeabilitu i po aplikaci Amblyominu X. Podání Amblyominu X nezměnilo ani zvýšenou vaskulární permeabilitu vyvolanou exogenním podáním VEGF-A. To naznačuje, že nijak nemění dráhy VEGF-A zodpovědné za kontrakci endoteliálních buněk. Dále byl zkoumán vliv Amblyominu X na expresi adhezních molekul buňkami endotelu *in vitro*. Jeho podání snížilo jejich migraci a adhezi k matrigelu a inhibovalo expresi adhezních molekul VCAM-1 a β<sub>3</sub> integrinu (Drewes et al., 2015).

Je známo, že mezi rakovinou a hemokoagulací existují vzájemné vztahy. Rakovina vyvolává hyperkoagulační stav (trombofilii), který se vyznačuje především náchylností ke zvýšené tvorbě trombů. Aktivované krevní destičky, srážení krve a fibrinolýza pak ovlivňují biologii nádorových buněk, růst nádorů, angiogenezi a metastatické procesy (Gerotziafas et al., 2008). V mnoha výzkumech a klinických studiích byl zjišťován vliv antikoagulační léčby na vývoj a progresi rakoviny. Mezi představitele této terapeutické třídy patří např. nefrakcionovaný (přírozený) heparin nebo nízkomolekulární hepariny, jako je dalteparin a enoxaparin (Bobek, 2012). Díky své antikoagulační funkci mohou inhibovat tvorbu trombinu a fibrinu vyvolanou rakovinnými buňkami a také ovlivňovat metastázy. I když jsou hepariny důležitým nástrojem při léčbě rakoviny, zejména při prevenci vzniku trombózy, v poslední době se studie zaměřují na jejich alternativy v podobě inhibitorů FXa (Zalpour et al., 2011). Ventura et al. (2013) prokázali, že Amblyomin X a heparin mají podobné účinky na progresi rakoviny a na normalizaci hyperkoagulačního stavu. Amblyomin X však vykazoval ve srovnání s heparinem zajímavější výsledky *in vitro*. Opět byl pozorován silný cytotoxický účinek na nádorovou linii B16F10, který vedl k apoptóze a zpomalení buněčného cyklu. Po 48 hodinové léčbě Amblyominem X byla snížena životaschopnost buněk až o 95 %, zatímco účinek heparinu byl mnohem mírnější. Mechanismem působení se Amblyomin X tedy od ostatních antikoagulancií zřejmě liší.

Buněčná migrace je nezbytná v mnoha biologických procesech, jako je například embryonální vývoj, angiogeneze, imunitní dohled a oprava a regenerace tkání. Aberantní regulace buněčné migrace řídí progresi mnoha patologických jevů, včetně metastáz nádorových onemocnění (Yamaguchi and Condeelis, 2007). Migrace buněk závisí na proteolytických enzymech, receptorech a dalších molekulách podílejících se na degradaci extracelulární matrix (ECM), přeskupení cytoskeletu a buněčné adhezi (Salamone et al., 2016). Nádorové a endotelové buňky exprimují v mikroprostředí nádoru vyšší množství receptorů pro urokinázu (uPAR) než normální buňky, což podporuje proteolýzu urokinázy

(uPA) a buněčnou migraci (Smith and Marshall, 2010). Systém uPA/uPAR hraje zásadní roli v aktivaci plazminogenu na plazmin a současně se podílí na aktivaci matrixmetaloproteináz, které se účastní degradace elementů ECM (Halámková et al., 2012). uPAR může také aktivovat intracelulární signální dráhy související s rodinou malých G-proteinů – Rho GTPázami (Hall, 2012). Tyto proteiny se podílejí na regulaci transkripce mnoha genů, čímž regulují velikost, polaritu a mobilitu buněk. Funkční inhibice uPAR inhibitory Kunitzova typu proto může modulovat přeskupení cytoskeletu a migraci, a tím regulovat metastázy. Schmidt et al. (2020) ve své studii prokázali, že Amblyomin X mění tvorbu aktinového skeletu, a že snižuje migraci nádorových buněk skrze modulaci signalizace uPAR, Rho GTPáz a snížením exprese matrixmetaloproteináz. U nenádorových buněk HUVECs ovšem na dezorganizaci cytoskeletu ani snižování motility žádný efekt neměl. Tato zjištění opět poukazují na jeho specifitu pro nádorové buňky.

Působení Amblyominu X bylo nedávno testováno také na modelu koňského melanomu. Koňské melanomy jsou spontánní nádory, které jsou na rozdíl od lidských melanomů zapouzdřené a lokálně omezené, takže méně často způsobují metastázy. U lidí i koní jsou však potenciálně imunogenní, tj. schopné vyvolávat imunitní odpovědi, a proto mohou sloužit jako model pro studium imunitních mechanismů podílejících se na regresi nádoru vyvolané terapeutickými molekulami. V první fázi experimentu byly nádory léčeny po dobu 30 dnů intratumorálními injekcemi Amblyominu X. Výsledky byly slibné. Neošetřené kontrolní nádory zachovaly svůj tvar a zvětšily se, zatímco nádory ošetřené Amblyominem X se významně zmenšily nebo dokonce úplně vymizely. U žádného z pěti léčených koní navíc nedošlo k žádným nežádoucím reakcím. V druhé fázi experimentu byla provedena analýza transkriptomu a analýza interakcí mezi proteiny nádorových buněk a Amblyominem X. Mezi nálezy transkriptomické analýzy byl detekován stres ER a mitochondrií, apoptóza a modulace vrozeného imunitního systému. Kromě toho bylo nově objeveno, že rychlá reakce vrozeného imunitního systému (již šest hodin po injekci) zahrnovala modulaci čtyř různých cest: TLR, RIG-I (receptory rozpoznávající virovou RNA), OAS (2'5' oligoadenylát syntetáza) a onkostatínu-M (cytokin z rodiny IL-6). Tato zjištění popsala první kroky aktivace obranné odpovědi, která vyvrcholila v regresi nádoru, a poukázala na nové potenciální cíle protinádorové terapie (Lichtenstein et al., 2020).

Farmakologická bezpečnost Amblyominu X byla zkoumána prostřednictvím testů akutní toxicity za použití zdravých myší. Po jeho podání byl rychle metabolizován v játrech a následně vylučován ledvinami. V histologické analýze nebylo pozorováno žádné poškození zdravých tkání, a to ani po intravenózním podání více než stonásobku účinné dávky.

Pozorovány nebyly ani žádné jiné vedlejší účinky, včetně zažívacích poruch nebo poruch chování. Oproti tomu u myši s ortotopicky implantovaným karcinomem ledvin byl Amblyomin X detekován již 30 minut po aplikaci ve stromatu nádoru, což zdůrazňuje jeho selektivitu pro nádorové buňky. Kromě toho byl v játrech nemocných myši detekován ještě 3 dny po jeho podání. U nemocných myši byly pozorovány také antimetastatické účinky Amblyominu X, kdy léčba tímto proteinem významně snížila výskyt plicních metastáz (de Souza et al., 2016).

Farmakokinetiku a biodistribuci Amblyominu X zkoumali také Bouffleur et al. (2019) u zdravých samic myši. Amblyomin X byl samicím intravenózně injikován a v různých časových bodech byla odebrána plazma a orgány, které byly následně analyzovány. Amblyomin X byl z plazmy rychle vylučován a v systémovém oběhu strávil pouze krátkou dobu. Rychlá eliminace pravděpodobně souvisí s neschopností Amblyominu X vázat se na albumin, významný protein odpovědný za transport sloučenin v plazmě. Po 10 minutách od aplikace byl tento protein nalezen v brzlíku, plicích a později také v srdci, játrech a ledvinách. Získaná data prokázala, že se Amblyomin X po jeho podání koncentruje v játrech, kde je metabolizován, a že je vylučován močí, vzhledem k prokázané přítomnosti v ledvinách a močovém měchýři. Je zajímavé, že byl nalezen v primární struktuře, což naznačuje, že nebyl hydrolyzován proteázami přítomnými v séru, jak je často pozorováno u jiných proteinových léčiv. Na druhou stranu, v moči byly nalezeny pouze jeho fragmenty, což naznačuje účast proteáz uvnitř tkání. Celkové výsledky neprokázaly afinitu Amblyominu X k žádnému orgánu, což poukazuje na jeho nízkou toxicitu, a tedy možnost jeho využití jako terapeutického prostředku.

### 7.2.3 RHcyst-1

Cystatiny jsou rodina pevně se vázajících reverzibilní inhibitorů cysteinových proteáz. Jsou distribuovány téměř ve všech organismech, včetně prokaryot (Kordiš and Turk, 2009). Mohou regulovat mnoho biologických procesů jako je zpracování a prezentace antigenu, fagocytóza, zánět, proliferace T buněk a progresu nádoru (Zavasnik-Bergant, 2008; Zhang et al., 2004). Celkem existují čtyři cystatinové podskupiny: typ I (stefiny), typ II (cystatiny), typ III (kininogeny) a typ IV (fetuiny) (Rawlings and Barrett, 1990).

RHcyst-1 byl identifikován ve slinách klíštěte *R. haemaphysaloides*. Je to intracelulární cystatin typu II, který inhibuje katepsiny typu L, B, C, H, S a papain, s nejsilnější afinitou ke katepsinu S. Byl exprimován ve všech vývojových stádiích, ale nejhojněji se vyskytoval ve vajíčkách a jeho exprese se během vývoje postupně snižovala. RNAi RHcyst-1 snižovala rychlost přisátí dospělých klíšťat a také snižovala rychlost líhnutí (Wang et al., 2015).

Popsány byly také jeho imunosupresivní vlastnosti. Bylo prokázáno, že působí silným inhibičním efektem zejména na dendritické buňky. V experimentu inhiboval diferenciaci dendritických buněk z prekurzorů kostní dřeně (BMDC) a potlačoval dendritickými buňkami zprostředkovanou aktivaci T lymfocytů (Wei et al., 2019).

Vzniku a vývoje nádorů se účastní katepsiny, což jsou cysteinové proteázy. S růstem, angiogenezí i metastazováním jsou spojené katepsiny B, H, K a L, které degradují extracelulární matrix (Andrade et al., 2016; Bian et al., 2016; Schweiger et al., 2004; Sudhan et al., 2016). Hladiny sérových katepsinů lze využít jako prognostické markery, např. u melanomu (Kos et al., 1997). Proto jsou považovány za slibné cíle pro léčbu rakoviny.

Rakovinné buňky sekretují katepsiny do svého okolí, takže inhibitory katepsinů mohou potenciálně bránit rozvoji nádorů a metastázám. Wei et al. (2018) ve své studii prokázali protinádorovou aktivitu cystatinu RHcyst-1. RHcyst-1 inhiboval proliferaci, migraci a invazivitu čtyř rakovinných linií *in vitro*. Po aplikaci cystatinu *in vivo* na model myšího melanomu B16F10 prokázali signifikantní redukci nádorů a prodloužení přežití myší. Zároveň došlo k poklesu hladiny myeloidních supresorových buněk (MDSC) v krvi. MDSC je heterogenní populace buněk, jež má zásadní schopnost tlumit odpověď T lymfocytů. Během tumorigeneze počet MDSC expanduje (Wu and Dai, 2017). U léčených myší byl také pozorován vzrůst T buněčné infiltrace do nádoru (Wei et al., 2018).

#### 7.2.4 Haemangin

Haemangin je inhibitor Kunitzova typu izolovaný ze slinných žláz tvrdého klíštěte *H. longicornis*. Bylo prokázáno, že je schopen narušit angiogenezi a proces hojení ran, a to pomocí inhibice proliferace buněk vaskulárního endotelu a indukci apoptózy. Mimo to také účinně inaktivoval trypsin, chymotrypsin a plazmin, což naznačuje jeho antiproteolytický účinek na angiogenní kaskády. V terapii nádorů by mohl být využit k blokování angiogeneze.

V experimentech Haemangin inhiboval angiogenezi na explantátu kuřecí aorty. Blokoval také diferenciaci, proliferaci a tvorbu cév u buněk HUVECs a neovaskularizaci u kuřecí chorioalantoidní membrány. To poukazuje na to, že může bránit jak již existující angiogenezi cév, tak neovaskularizaci. Kromě toho zároveň výrazně indukoval apoptózu buněk endotelu. Pozorována byla modulace širokého spektra genů spojených s různými biologickými procesy včetně apoptózy, angiogeneze a hojením ran. Při testování buněčné proliferace bylo prokázáno, že nepůsobil cytotoxicky (měřením aktivity laktát dehydrogenázy), takže není toxický pro buňky savců.

Haemangin byl schopen inhibovat různé fáze hojení ran, od proteolytické degradace ECM po proliferaci a diferenciaci endotelových buněk. Tímto způsobem zřejmě klíště

zabraňuje odmítnutí hostitelem a přispívá k úspěšnému sání krve. Je zajímavé, že u měkkých klíšťat, které na rozdíl od tvrdých klíšťat sají krev daleko kratší dobu, nebyly detekovány žádné homology Haemanginu, což poukazuje na možnou důležitost této molekuly při dlouhodobém krmení (Islam et al., 2009).

### 7.2.5 Longistatin

Longistatin je protein o velikosti 15,5 kDa, který byl také poprvé izolován ze slinných žláz klíštěte *H. longicornis*. Obsahuje dvě funkční EF-hand domény a je schopen vázat vápník. Je exprimován ve všech fázích životního cyklu a u klíšťat aktivně sajících krev je pozorována jeho upregulace (Anisuzzaman et al., 2010).

Bylo prokázáno, že je schopen vázat se na fibrinovou síť, a že specificky přeměňuje plazminogen na aktivní plazmin, čímž vyvolává lýzu fibrinové sraženiny a trombů. Zároveň také degraduje fibrinogen a je schopen tvorbu fibrinové sraženiny zpomalit. To poukazuje na jeho nezbytnost pro úspěšné krmení a přežití klíšťat. Data získaná při testování tohoto proteinu naznačují možnost jeho využití jako terapeutického prostředku při léčbě lidských onemocnění, jako je např. trombóza nebo různé kardiovaskulární příhody (Anisuzzaman et al., 2011).

Longistatin navíc moduluje imunitní reakce hostitele a tvorbu zánětu vazbou na receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE), který zprostředkovává aktivaci imunitních buněk, a který je vysoce exprimován v místě kousnutí klíštěte (Anisuzzaman et al., 2014).

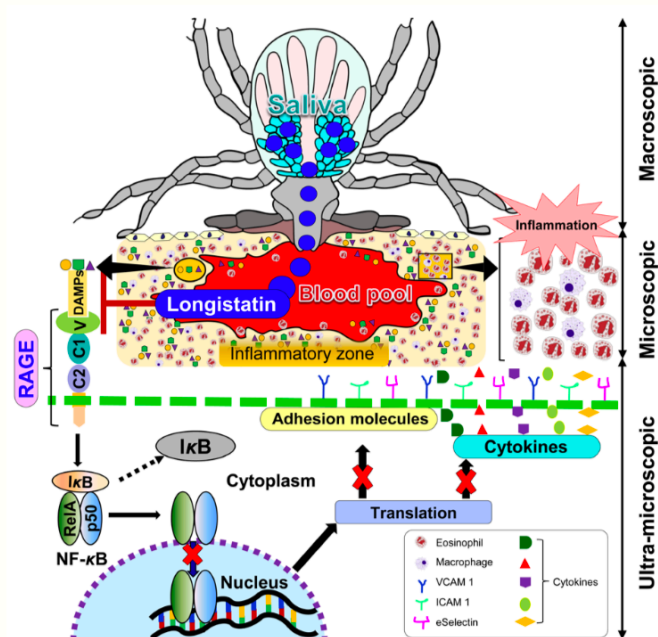
Souvislost mezi zánětem a rakovinou se předpokládá již dlouho, a to kvůli přítomnosti zánětlivých buněk v mikroprostředí nádoru, včetně myeloidních buněk a makrofágů asociovaných s nádory (TAM). Tyto buňky významně zvyšují růst nádorů a metastazování a jsou klíčovými inhibitory protinádorové imunity (Noy and Pollard, 2014). Bylo prokázáno, že imunitní buňky na svém povrchu exprimují RAGE. Jeho exprese byla detekována u různých typů buněk v nádorovém mikroprostředí, včetně makrofágů. U myšího modelu rakoviny prsu bylo pozorováno, že blokování signalizace RAGE významně inhibovalo růst nádoru, metastázy a angiogenezi. Tato zjištění naznačují, že RAGE může regulovat mikroprostředí nádoru a zvýšit tak růst tumoru nebo podporovat metastázy. Vzhledem k tomu by mohl být novým cílem pro kontrolu růstu nádorů prsu a jejich metastáz (Nasser et al., 2016).

Ve studii Anisuzzaman et al. (2014) bylo prokázáno, že se Longistatin vázal na V doménu RAGE způsobem závislým na koncentraci. V přítomnosti  $Ca^{2+}$  byla vazba přibližně třikrát silnější. V buňkách HUVECs účinně přerušil produkci ROS ligandem RAGE. Navíc také soutěžil s ligandy RAGE, včetně různých alarminů, a účinně bránil fosforylaci a degradaci proteinu I $\kappa$ B $\alpha$  a inhiboval translokaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B. Kromě toho významně



potlačoval expresi adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1 a E-selektinu. Longistatin dále významně snižoval sekreci cytokinů. Mezi nimi byl např. cytokin stimulující produkci granulocytů a jejich uvolnění do krevního oběhu – G-CSF nebo transformující růstový faktor – TGF- $\beta$ .

Díky své schopnosti blokovat aktivaci RAGE, jež má zásadní roli při zánětu, může být Longistatin významným terapeutickým prostředkem při léčbě chorob zprostředkovaných RAGE, jako je např. Alzheimerova choroba, lupénka, diabetické komplikace nebo tumorigeneze (Anisuzzaman et al., 2015).



**Obr.5: Schematické znázornění účinku Longistatinu.** Klíšťata způsobují rozsáhlé poškození tkáně. Poraněné tkáně uvolňují DAMPs nebo alarminy, které jsou zodpovědné za vyvolání zánětu zejména prostřednictvím RAGE. Longistatin brání interakci receptoru s DAMPs, blokuje adhezní molekuly, produkci příslušných cytokinů a brání nukleární translokaci NF- $\kappa$ B (Anisuzzaman et al., 2015).

## 7.2.6 HLTnI

HLTnI je molekula podobná troponinu I, která byla poprvé identifikována ve slinách klíštěte *H. longicornis* (You et al., 2001).

Troponin je regulační protein, který se skládá ze tří podjednotek: troponinu C, T a I. Troponin C váže vápenaté ionty, troponin T se váže na tropomyosin a troponin I se váže na aktin a zabraňuje kontrakci svalu blokadí aktomyozin ATPázy (Leavis and Gergely, 1984). Troponiny byly dříve považovány za molekuly specifické pro svaly. Bylo však prokázáno, že troponin I (TnI) je distribuován i jinde, např. ve chrupavkách nebo rohovce (Kinoshita et al., 2001; Moses et al., 1999). To poukazuje na to, že se troponiny účastní i jiných procesů, než

jen zprostředkování a regulace kontrakce příčně-pruhovaného svalu. Některé studie uvádějí, že lidský TnI má schopnost inhibovat angiogenezi, a že by mohl být využit pro regulaci rakoviny (Kern et al., 2003).

V *in vitro* experimentu rekombinantní HLTnI významně potlačoval kapilární vývoj u buněk HUVECs způsobem závislým na dávce. Mechanismus tohoto účinku je ale nejasný (Fukumoto et al., 2006). U lidského TnI bylo prokázáno, že jeho aktivní místo, které inhibuje aktomyosin ATPázu během svalové kontrakce, je zároveň zodpovědné za antiangiogenní vlastnosti tohoto proteinu, a že aktivita je modulována downregulací exprese adhezní molekuly ICAM-1 prostřednictvím downregulace exprese VEGF (Kern et al., 2003). Uvádí se také, že TnI inhibuje proliferaci endoteliálních buněk interakcí s receptorem bFGF (Feldman and Rouleau, 2002). Strukturní podobnost HLTnI s lidským TnI tedy naznačuje, že by HLTnI také mohl interagovat s receptory pro VEGF a bFGF na endoteliálních buňkách a tím bránit angiogenezi. Je však potřeba dalšího zkoumání.

Jelikož je angiogeneze brána jako základní proces při růstu nádorů a metastazování, HLTnI by mohl díky svým antiangiogenním vlastnostem potenciálně sloužit jako terapeutické činidlo při léčbě rakoviny (Fukumoto et al., 2006).

### 7.2.7 Calreticulin

Calreticulin (CRT) je hlavní protein endoplazmatického retikula savčích buněk, který ovlivňuje mnoho biologických funkcí jak v lumen, tak mimo prostředí ER. V lumen ER plní dvě hlavní funkce: chaperonizaci a regulaci homeostázy  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Podílí se také na syntéze různých molekul včetně iontových kanálů, povrchových receptorů, integrinů a transportérů (Michalak et al., 1999).

Jeho rekombinantní forma (rCRT) byla detekována i ve slinách některých klíšťat, jako je např. *A. americanum*, *D. variabilis*, *B. microplus* a *I. scapularis* (Ferreira et al., 2002; Jaworski et al., 1995; Valenzuela et al., 2002). Bylo navrženo, že jeho funkce zřejmě spočívá v usnadnění krmení klíšťat, a že napomáhá přenosu patogenů prostřednictvím inhibice C1q složky komplementu a inhibicí koagulace (Kaewhom et al., 2008).

Všeobecně je přijímáno, že Calreticulin funguje jako inhibitor angiogeneze, který se přímo zaměřuje na proliferaci a adhezi endoteliálních buněk, inhibuje angiogenezi a potlačuje růst tumoru. Mimo jiné podporuje i hojení kožních ran (Pike et al., 1999; Ramírez-Tolosa et al., 2015). Dosud ovšem neexistují konkrétní vědecké údaje, které by tyto funkce prisuzovaly i klíštěcímu CRT, a proto je potřeba dalšího zkoumání.

## 8 DISKUZE

Savčí hemostatický a imunitní systém představují komplexní síť zahrnující různé humorální a buněčné struktury a procesy, které jsou nezbytné pro ochranu před nemocemi, zraněními nebo jinými potenciálně škodlivými patogeny. Jakékoliv poruchy imunitního systému mohou mít za následek imunodeficienci, autoimunitní onemocnění, zánětlivá onemocnění nebo dokonce rakovinu, na které se podílejí události vrozené a adaptivní imunity, ale také koagulační faktory. Současné možnosti léčby těchto onemocnění jsou často nedostatečné. Vědci proto hledají alternativní léky přírodního původu, např. z rostlin, mikroorganismů, ale i živočichů (Štibrániová et al., 2019). Členovci jsou velice rozmanitá skupina se širokou škálou biologických aktivit. Farmakologický potenciál jejich produktů nebo jich samotných naznačuje, že jsou bohatým, avšak dosud neprozkoumaným zdrojem užitečných sloučenin, jež by mohly být využity pro vývoj nových terapeutických prostředků moderní medicíny (Pemberton, 1999).

Klíšťata jsou velice významným zdrojem farmakologicky aktivních látek. Jejich sliny obsahují stovky proteinů a nízkomolekulárních efektorů s imunomodulačními, protizánětlivými, antikoagulačními, antiagregačními, protinádorovými a antiangiogenními vlastnostmi s vysokou afinitou, aviditou a selektivitou pro jejich cíle v obranných mechanismech hostitele. Mnoho klíštěcích molekul vykazuje specifické, avšak přesto neznámé funkce a způsoby působení. Objasnění způsobu působení bioaktivních molekul klíštěcích slin na regulaci buněčných procesů u jejich savčích hostitelů by mohlo poskytnout nové nástroje pro pochopení komplexních poruch vedoucích k poruchám imunity a rakovině. Průzkum a využití farmakologického potenciálu klíšťat je však ještě v plenkách (Štibrániová et al., 2019).

Rozhodování o tom, zda je léčivo připraveno pro klinické studie u lidí, zahrnuje preklinické testování. To poskytuje předběžné informace o jeho účinnosti, toxicitě, farmakokinetice a bezpečnosti. Jednotlivé dávky léčiva jsou testovány pomocí experimentů *in vitro* ve zkumavkách či na buněčných kulturách, *in vivo* na zvířecích modelech, anebo *in silico* na počítačových modelech<sup>1</sup>. Následné klinické testování na lidech sestává ze čtyř fází, při kterých se testuje průběh léčby, hledá se vhodná dávka a pozorují se případné vedlejší účinky. Pokud je po prvních třech fázích prokázáno, že je lék bezpečný a účinný, je schválen pro klinické využití a nadále jsou sledovány jeho účinky<sup>2</sup>.

Některé molekuly klíštěcích slin s potenciálem pro vývoj nových léčiv byly již testovány na různých zvířecích modelech lidských onemocnění a prokázaly slibné výsledky. Bohužel pouze několik z nich postoupilo do preklinických zkoušek. Jsou to např. Ir-CPI, TAP, OmCI

nebo Ra-HBP. Antitrombotický protein Ir-CPI prokázal v preklinických studiích svou účinnost při inhibici kontaktní fáze koagulační kaskády a zabraňoval srážení krve u králičích modelů katerizační okluze a arteriovenózního zkratu během kardiopulmonálního bypassu (Pireaux et al., 2019). Antikoagulační peptid TAP vykazoval slibné výsledky v modelech venózní a arteriální trombózy *in vivo*. Jeho účinnost na srážení krve byla schválena v předběžných preklinických experimentech, avšak u lidí nebyl nikdy zkoumán, a to hlavně kvůli jeho antigenicitě, tedy schopnosti vyvolat tvorbu protilátek (Yeh et al., 2012). Údaje z preklinických studií lipokalinu OmCI prokázaly jeho účinnost při léčbě onemocnění zprostředkovaných komplementem a u lipokalinu Ra-HBP byly prokázány příznivé účinky při léčbě lidských alergií (Štibrániová et al., 2019; Weston-Davies et al., 2014).

Rakovina je celosvětově hlavní příčinou morbiditu a mortality. Její výskyt roste v důsledku stárnutí populace, genetické zátěže, nevhodných životních návyků, environmentálních faktorů a industrializace. Celosvětová data podle GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) zahrnují přibližně 19,3 milionu nových případů rakoviny a téměř 10 milionů úmrtí spojených s rakovinou v roce 2020. Navzdory významu rakoviny pro veřejné zdraví jsou však současné možnosti léčby nedostatečné. Proto je potřeba nových terapeutických přístupů k upravení nebo nahrazení stávající léčby, jež má často omezenou účinnost nebo řadu vedlejších účinků (Sousa et al., 2015; Sung et al., 2021). U slin některých klišťat byl prokázán specifický účinek na nádorové buňky. Identifikovány byly také konkrétní molekuly s protinádorovým účinkem, které by potenciálně mohly najít své využití v nádorové terapii (Tab. I). Dvě z nich, Ixolaris a Amblyomin X, byly již testovány v preklinických zkouškách.

Jak již bylo zmíněno v kapitole výše, protein Ixolaris by mohl najít své využití v RTT. Vývoj radiofarmak pro léčebné a diagnostické účely probíhá ve čtyřech fázích, z nichž jedna je preklinická a tři klinické. Preklinická fáze sestává ze studií biodistribuce a radiační dozimetrie prováděných na zvířatech s cílem charakterizovat bezpečnost a účinnost radiofarmaka před testováním na lidech (Stabin, 2017).

Kožní melanom je jedním z nejrychleji rostoucích maligních nádorů posledních desetiletí. Na rozdíl od mnoha jiných typů rakoviny postihuje zejména mladší populaci a je znám svou tendencí k metastázování a špatnou odpovědí na současné terapeutické metody (Li et al., 2002). Uznává se také, že v 95 % případů je léčitelný, pokud je včas diagnostikován a chirurgicky odstraněn. Včasná detekce může zamezit využití agresivních terapií, jako je chemoterapie a radioterapie a snížit riziko vzniku metastáz (Figueiredo et al., 2019; Satyamoorthy and Herlyn, 2002). Barboza et al. (2015) vyvinuli nové radiofarmakum

<sup>99</sup>Tc-Ixolaris. U nemocných myší byly provedeny snímky jeho afinity v zájmových orgánech pro diagnostiku melanomu, dozimetrické studie a sledována byla i jeho biodistribuce. Vývoj takového diagnostického nástroje zvyšuje možnosti hodnocení a sledování pacientů s rakovinou kůže prostřednictvím porozumění patofyziologickým mechanismům. Figueiredo et al. (2019) provedli dozimetrické studie <sup>99</sup>Tc-Ixolaris u myší s uměle aplikovaným melanomem B16F10 za účelem stanovení jeho biokinetického modelu. V úvahu vzali hmotnostní a metabolické rozdíly mezi myšmi a člověkem a stanovili účinnou dávku tohoto radiofarmaka. Došli k závěru, že zahájení klinického testování na lidech je bezpečné, jelikož jak odhadovaná absorbovaná dávka v kritických orgánech, tak efektivní dávky byly v souladu s těmi, které byly pozorovány v jiných dobře zavedených diagnostických metodách. Barboza et al. (2020) ve své studii hodnotili působení dalšího radiofarmaka, <sup>131</sup>I-Ixolaris, také při experimentální léčbě myšího melanomu. Soustředování emitovaných beta částic z radionuklidu do mikroprostředí nádoru prokázalo schopnost proteinu Ixolaris rozpoznávat nádory exprimující TF. Prokázali, že <sup>131</sup>I-Ixolaris může přímo interferovat s progresí nádoru narušením signalizace zprostředkované TF, která je spojena s pronádorovými odpověďmi, včetně angiogeneze a produkce cytokinů, jako je IL-8 a VEGF (Graf and Ruf, 2018). Podobných výsledků dosáhli i Ashrafi et al. (2012), kteří využili protilátku anti-VEGF značenou <sup>131</sup>I (<sup>131</sup>I-Bevacizumab) a také prokázali významné snížení progresu nádoru. Na rozdíl od protilátek, které mají velkou molekulární hmotnost, jsou však peptidy menší molekuly, které mohou snadněji proniknout do tkání a mohou také vykazovat nižší antigenicitu. V závěru bylo potvrzeno, že stejně jako radiofarmakum <sup>99</sup>Tc-Ixolaris, i <sup>131</sup>I-Ixolaris vykazuje optimální vlastnosti pro využití v terapii kožního melanomu (Barboza et al., 2020).

Amblyomin X je protinádorová molekula, která, jak již bylo zmíněno výše, působí specificky na nádorové buňky a indukuje jejich apoptózu prostřednictvím inhibice proteazomální aktivity. Některé inhibitory proteazomu jsou v současné době využívány v nádorové terapii. Příkladem je bortezomib nebo carfilzomib, oba schválené FDA pro léčbu refrakterního mnohočetného myelomu, což je malignita krve (Herndon et al., 2013; Kane et al., 2006). Tyto inhibitory proteazomu a další, které jsou v klinických studiích, jsou malé molekuly nebo peptidy, které přímo procházejí membránou rakovinných buněk. Selektivita těchto sloučenin přesně souvisí spíše s jejich působením na proteazom, než s typem nádorové buňky (Chudzinski-Tavassi et al., 2016). Schmidt et al. (2020) ve své studii hodnotili působení Amblyominu X a bortezomibu na rakovinné a normální buňky. Souhrnné výsledky prokázaly, že oba působí odlišně. Bortezomib je využíván jako chemoterapeutikum při léčbě rakoviny,

avšak jeho účinky se neomezují pouze na rakovinné buňky a vyvolávají řadu vedlejších účinků, mezi něž patří např. přechodná trombocytopenie, leukopenie nebo změny v histologii jater (Rosiñol et al., 2005; Satoh et al., 2011). Schmidt et al. (2020) ve svých experimentech skutečně pozorovali, že bortezomib: (a) vyvolal cytotoxicitu a dezorganizaci cytoskeletu jak u nádorových, tak u endotelových buněk, (b) moduloval matrixmetaloproteázy ve všech typech buněk a (c) zvýšil hladinu RhoA GTPázy u normálních i nádorových buněk, což by mohlo usnadnit metastazování a angiogenezi nádoru během léčby. Oproti tomu Amblyomin X vyvolával změny pouze v rakovinných buňkách a na normální buňky žádný efekt neměl. Kromě toho navíc blokoval uPAR signalizaci a tím narušoval migraci nádorových buněk, což je oproti bortezomibu jeho velkou výhodou.

Z jakého důvodu Amblyomin X cílí pouze na nádorové buňky zatím není známo. Jeho selektivita však může být připsána interakcím se specifickými prvky, jako jsou fosfolipidy, které jsou v membráně rakovinných buněk transmutovány. Transmutace v membránových fosfolipidech nádorových buněk je důležitým jevem souvisejícím s maligní transformací, tumorigenicitou, metastázami a trombózou (Branco et al., 2016). Dalším možným důvodem, proč jsou účinkem Amblyominu X postiženy pouze nádorové buňky může být i fakt, že dělicí se buňky jsou více citlivé na inhibici proteazomu než buňky klidové (Maria et al., 2013).

Preklinickému testování Amblyominu X se věnovala brazilská skupina Maria et al. (2019). Jejich cílem bylo stanovení jeho bezpečnostního profilu pomocí testů akutní a subakutní toxicity u zdravých myší. Po ošetření tímto proteinem bylo hodnoceno obecné chování testovaných myší, kolísání tělesné hmotnosti, příjem vody a potravy, mortalita a také biochemické, hematologické a histopatologické parametry. Během léčby nebyla pozorována žádná úmrtnost a obecně byl pozorován nízký profil toxicity, jelikož většina toxických účinků (snížení přírůstku tělesné hmotnosti, pokles počtu krevních destiček v krvi, histologické změny jater) byla reverzibilních a pozorovatelných jen při vyšších dávkách. V závěru této studie byla stanovena maximální tolerovatelná dávka (MTD) a úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL). Při těchto dávkách nebyly pozorovány žádné důležité histopatologické změny a byl stanoven bezpečnostní profil pro léčbu tímto novým protinádorovým léčivem.

Vzhledem k uspokojivým výsledkům preklinických zkoušek Amblyominu X zahájila brazilská farmaceutická společnost União Química Farmacêutica Nacional S/A v roce 2017 první fázi klinického testování. Tato fáze byla zaměřena na léčbu pacientů s pokročilými solidními tumory. Klinické zkoušky byly bohužel hned v první fázi pozastaveny kvůli nežádoucím účinkům a hematologické toxicitě. Podle nejnovějších informací bylo ovšem

klinické testování opět zahájeno v únoru 2021 a předpokládaným datem dokončení první fáze je květen 2022<sup>3</sup>.

Využití molekul klíštěcích slin k léčbě lidských onemocnění není vůbec jednoduché. Farmakokinetika a farmakodynamika klíštěcích proteinů může výrazně omezit jejich terapeutický potenciál a podobně jako jiné velké molekuly exogenního původu jsou klíštěcí proteiny silně imunogenní (Chmelař et al., 2019). To lze překonat pomocí několika modifikací, jako je např. PEGylace (připojení polymerů polyethylenglykolu), která by měla kromě snížení imunogenicity zároveň také snížit rozpustnost (Veronese and Mero, 2008). Další možností je tzv. humanizace proteinů. Tento přístup byl s velkým úspěchem použit u monoklonálních protilátek designovaných především pro léčbu rakoviny, kdy došlo k přenesení hypervariabilních částí myších protilátek na strukturní základ lidských protilátek (De Groot and Scott, 2007). Podobný přístup by mohl být použit i pro klíštěcí serpiny, kde by reaktivní středová smyčka (RCL), která je zodpovědná za serpinovou specifitu, byla klíštěcího původu a konzervovaná serpinová kostra by byla lidského původu. Dosud ovšem neexistují žádné experimentální důkazy, kde by byl tento postup úspěšný. Současné chápání interakcí mezi klíštěcími slinami a imunitním systémem hostitele je stále neúplné a imunitní tolerance není jedinou překážkou při přeměně klíštěcích proteinů na léky (Chmelař et al., 2019).

Kromě imunogenicity je u malých proteinů a peptidů obsažených ve slinách klíšťat dalším problémem jejich krátký poločas v tělním oběhu (Chmelař et al., 2019). Tento problém lze řešit fúzí studovaného proteinu s Fc fragmentem lidského IgG (De Groot and Scott, 2007). Taková fúze byla provedena s klíštěcím proteinem Evasinem-4, avšak bez úspěchu (Bonvin et al., 2016). Relativně nová metoda podobná PEGylaci je PASylace (proteinová konjugace s polymerní sekvencí Pro, Ala, Ser), která může prodloužit poločas proteinu v oběhu o několik dní (Schlapschy et al., 2013). Existují způsoby, jak upravit slinné proteiny klíšťat za účelem zlepšení jejich farmakokinetiky a farmakodynamiky, z nichž některé byly již úspěšně použity. Příkladem je PASylace klíštěcího lipokalinu OmCI (Coversinu), která inhibuje jeho degradaci v plazmě (Kuhn et al., 2016).

Další komplikací ve vývoji léčiv založených na klíštěcích molekulách je identifikace způsobu působení jednotlivých molekul v komplexní směsi slin, kde se v kontextu krmení klíšťat předpokládá synergický účinek. Pro terapeutický přínos je tedy nutná identifikace interagujících partnerů. V neposlední řadě jsou velmi důležité vysoké náklady pro vývoj nových léčiv založených na klíštěcích slinách, takže schvalovací procesy nejsou příliš atraktivní (Murfin and Fikrig, 2017).

**Tab. I: Shrnutí molekul klíčících slin s protinádorovými účinky.**

<b>Biomolekula</b>	<b>Klíště</b>	<b>Protinádorový účinek</b>	<b>Literatura</b>
<b>Ixolaris</b>	<i>I. scapularis</i>	Antikoagulační vlastnosti Inhibice růstu tumoru Redukce vaskularizace tumoru Antimetastatické účinky Inhibice angiogeneze Inhibice PAR2 signalizace	Carneiro-Lobo et al., 2009, 2012; de Oliveira et al., 2012; Francischetti et al., 2002; Monteiro et al., 2005, 2008
<b>Amblyomin X</b>	<i>A. cajennense (A. sculptum)</i>	Antikoagulační vlastnosti Inhibice růstu tumoru Antimetastatické účinky Indukce apoptózy Inhibice autofagie Inhibice angiogeneze Inhibice proliferace a migrace Inhibice uPAR signalizace	Akagi et al., 2012; Batista et al., 2010; Branco et al., 2016; Chudzinski-Tavassi et al., 2010, 2016; de Souza et al., 2016; Drewes et al., 2012, 2015; Lichtenstein et al., 2020; Maria et al., 2013; Morais et al., 2016; Pacheco et al., 2016; Schmidt et al., 2020; Ventura et al., 2013
<b>RHcyst-1</b>	<i>R. haemaphysaloides</i>	Inhibice proliferace a migrace Redukce velikosti tumoru	Wang et al., 2015; Wei et al., 2018
<b>Haemangin</b>	<i>H. longicornis</i>	Inhibice angiogeneze Indukce apoptózy	Islam et al., 2009
<b>Longistatin</b>	<i>H. longicornis</i>	Blokování signalizace RAGE	Anisuzzaman et al., 2010, 2014, 2015
<b>HLTnI</b>	<i>H. longicornis</i>	Inhibice angiogeneze	Fukumoto et al., 2006; You et al., 2001
<b>Calreticulin</b>	<i>A. americanum</i> <i>D. variabilis</i> <i>B. microplus</i> <i>I. scapularis</i>	Inhibice angiogeneze	Ferreira et al., 2002; Jaworski et al., 1995; Valenzuela et al., 2002



## 9 ZÁVĚR

- Klíštěcí sliny jsou významným zdrojem biologicky aktivních látek se slibným terapeutickým potenciálem pro léčbu některých lidských onemocnění včetně rakoviny.
- Sliny některých klíšťat prokazatelně vykazují protinádorové účinky a několik konkrétních molekul zodpovědných za tuto aktivitu bylo již identifikováno.
- Mezi takové molekuly se řadí Ixolaris, Amblyomin X, RHcyst-1, Haemangin, Longistatin, HLTnI a Calreticulin.
- Proteiny Ixolaris a Amblyomin X byly již testovány v preklinických zkouškách, přičemž Amblyomin X je v současné době v první fázi testování na lidech.
- Vývoj terapeutických prostředků založených na klíštěcích slinách je komplikovaný a možnými překážkami jsou vysoké náklady nebo silná imunogenicita klíštěcích proteinů.

## **10 SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ**

<sup>1</sup> <https://www.profil.com/knowledge-center/trial-stages>

<sup>2</sup> <https://www.nia.nih.gov/health/what-are-clinical-trials-and-studies>

<sup>3</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03120130>

## 11 SEZNAM LITERATURY

Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I., Micko, C., Casper, K., Dillehay, D.L., Nawroth, P.P., and Rickles, F.R. (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. *96*, 8663–8668.

Akagi, E.M., de Sá Júnior, P.L., Simons, S.M., Bellini, M.H., Barreto, S.A., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2012). Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “*in vitro*.” *Biomed Pharmacother*. *66*, 64–69.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. *30*, 459–489.

Anderson, J.F., and Magnarelli, L.A. (2008). Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am*. *22*, 195–215.

Andrade, S.S., Gouvea, I.E., Silva, M.C., Castro, E.D., de Paula, C.A., Okamoto, D., Oliveira, L., Peres, G.B., Ottaiano, T., Facina, G., Nazário, A.C., Campos, A.H., Paredes-Gamero, E.J., Juliano, M., da Silva, I.D., Oliva, M.L., and Girão, M.J. (2016). Cathepsin K induces platelet dysfunction and affects cell signaling in breast cancer – molecularly distinct behavior of cathepsin K in breast cancer. *BMC Cancer*. *16*, 173.

Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W.R., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P.W., Rincón, M., Kantor, F.S., and Fikrig, E. (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Immunity*. *16*, 849–859.

Anisuzzaman, Islam, M.K., Miyoshim, T., Alim, M.A., Hatta, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., and Tsuji, N. (2010). Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is required for acquisition of host blood-meals. *Int J Parasitol*. *40*, 721–729.

Anisuzzaman, Islam, M.K., Alim, M.A., Miyoshi, T., Hata, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., and Tsuji, N. (2011). Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathog*. *7*, e1001312.

Anisuzzaman, Hatta, T., Miyoshi, T., Matsubayashi, M., Islam, M.K., Alim, M.A., Anas, M.A., Hasan, M.M., Matsumoto, Y., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Fujisaki, K., and Tsuji, N. (2014). Longistatin in tick saliva blocks advanced glycation end-product receptor activation. *J Clin Invest.* *124*, 4429–4444.

Anisuzzaman, Alim, M.A., and Tsuji, N. (2015). Longistatin in tick-saliva targets RAGE. *Oncotarget.* *6*, 35133–35134.

Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., and Kotsyfakis, M. (2020). Tick salivary compounds for targeted immunomodulatory therapy. *Front Immunol.* *11*, 583845.

Ashrafi, S.A., Hosseinimehr, S.J., Varmira, K., and Abedi, S.M. (2012). Radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-Bevacizumab as a specific molecule for cells with overexpression of the vascular endothelial growth factor. *Cancer Biother Radiopharm.* *27*, 420–425.

Askenase, P.W., Bursztajn, S., Gershon, M.D., and Gershon, R.K. (1980). T cell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. *J Exp Med.* *152*, 1358–1374.

Assumpção, T.C., Mizurini, D.M., Ma, D., Monteiro, R.Q., Ahlstedt, S., Reyes, M., Kotsyfakis, M., Mather, T.N., Andersen, J.F., Lukszo, J., Ribeiro, J.C.M., and Francischetti, I.M.B. (2018). Ixonnexin from tick saliva promotes fibrinolysis by interacting with plasminogen and tissue-type plasminogen activator, and prevents arterial thrombosis. *Sci Rep.* *8*, 4806.

Barboza, T., Gomes, T., Mizurini, D.M., Monteiro, R.Q., König, S., Francischetti, I.M.B., Signoretti, P.V.P., Ramos, I.P., Gutfilen, B., and Souza, S.A.L. (2015). <sup>99m</sup>Tc-Ixolaris targets glioblastoma-associated tissue factor: *in vitro* and pre-clinical applications. *Thromb Res.* *136*, 432–439.

Barboza, T., Gomes, T., da Costa Medeiros, P., Ramos, I. P., Francischetti, I.M.B., Monteiro, R.Q., Gutfilen, B., and Souza, S.A.L. (2020). Development of <sup>131</sup>I-ixolaris as a theranostic agent: metastatic melanoma preclinical studies. *Clin Exp Metastasis.* *37*, 489–497.

- Batista, I.F.C., Ramos, O.H.P., Ventura, J.S., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2010). A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys.* 493, 151–156.
- Beaufays, J., Adam, B., Decrem, Y., Prévôt, P.P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Lins, L., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2008a). *Ixodes ricinus* tick lipocalins: identifications, cloning, phylogenetic analysis and biochemical characterization. *PLoS One.* 3, e3941.
- Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prévôt, P.P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Lins, L., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2008b). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One.* 3, e3987.
- Bensaoud, C., Abdelkafi-Koubaa, Z., Mabrouk, H.B., Morjen, M., Hmila, I., Rhim, A., Ayeb, M.E., Marrakchi, N., Bouattour, A., and M'ghirbi, Y. (2017). *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) salivary gland extract inhibits angiogenesis and exhibits *in vitro* antitumor effects. *J Med Ent.* 54, 1476–1482.
- Bergman, D.K., Palmer, M.J., Caimano, M.J., Radolf, J.D., and Wikel, S.K. (2000). Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J Parasitol.* 86, 516–525.
- Bian, B., Mongrain, S., Cagnol, S., Langlois, M.J., Boulanger, J., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Boudreau, F., and Rivard, N. (2016). Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Mol Carcinog.* 55, 671–687.
- Binnington, K.C. (1978). Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Int J Parasitol.* 8, 97–115.
- Blisnick, A.A., Foulon, T., and Bonnet, S.I. (2017). Serine protease inhibitors in ticks: an overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 7, 199.

- Bobek, V. (2012). Anticoagulant and fibrinolytic drugs: possible agents in treatment of lung cancer? *Anticancer Agents Med Chem.* *12*, 580–8.
- Bonvin, P., Power, C.A., and Proudfoot, A.E. (2016). Evasins: therapeutic potential of a new family of chemokine-binding proteins from ticks. *Front Immunol.* *7*, 208.
- Bouffleur, P., Sciani, J.M., Goldfeder, M., Faria, F., Branco, V., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2019). Biodistribution and pharmacokinetics of Amblyomin-X, a novel antitumour protein drug in healthy mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* *44*, 111–120.
- Bowman, A.S., Dillwith, J.W., and Sauer, J.R. (1996). Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol Today.* *12*, 388–396.
- Bowman, A.S., and Sauer, J.R. (2004). Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology.* *129*, 67–82.
- Bowman, A.S., Ball, A., and Sauer, J.R. (2008). Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. *Ticks: Biology, Disease and Control.* 73–91.
- Branco, V.G., Iqbal, A., Alvarez-Flores, M.P., Sciani, J.M., de Andrade, S.A., Iwai, L.K., Serrano, S.M.T., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2016). Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. *Biochim Biophys Acta.* *1864*, 1428–1435.
- Carneiro-Lobo, T.C., Konig, S., Machado, D.E., Nasciutti, L.E., Forni, M.F., Francischetti, I.M.B., Sogayar, M.C., and Monteiro, R.Q. (2009). Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost.* *7*, 1855–1864.
- Carneiro-Lobo, T.C., Schaffner, F., Disse, J., Ostergaard, H., Francischetti, I.M.B., Monteiro, R.Q., and Ruf, W. (2012). The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells. *J Thromb Haemost.* *10*, 1849–1858.

Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunological Reviews*. 197, 179–191.

Cavassani, K.A., Aliberti, J.C., Dias, A.R.V., Silva, J.S., and Ferreira, B.R. (2005). Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 114, 235–245.

Cheng, Y., Wu, H., and Li, D. (1999). An inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. *Sci China C Life Sci*. 42, 457–464.

Chinery, W.A. (1973). The nature and origin of the “cement” substance at the site of attachment and feeding of adult *Haemaphysalis spinigera* (Ixodidae). *J Med Ent*. 10, 355–362.

Chmelař, J., Oliveira, C.J., Řezáčová, P., Francischetti, I.M.B., Kovářová, Z., Pejler, G., Kopáček, P., Ribeiro, J.C.M, Mareš, M., Kopecký, J., and Kotsyfakis, M. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. 117, 736–744.

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

Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H., and Kotsyfakis, M. (2017). Protease inhibitors in tick saliva: the role of serpins and cystatins in tick-host-pathogen interaction. *Front Cell Infect Microbiol*. 7, 216.

Chmelař, J., Kotál, J., Kovaříková, A., and Kotsyfakis, M. (2019). The use of tick salivary proteins as novel therapeutics. *Frontiers in physiology*. 10, 812.

Chudzinski-Tavassi, A.M., De-Sá-Júnior, P.L., Simons, S.M., Maria, D.A., de Souza Ventura, J., de Fátima Correia Batista, I., Faria, F., Durães, E., Reis, E.M., and Demasi, M. (2010). A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*. 56, 1145–1154.

Chudzinski-Tavassi, A.M., Morais, K.L., Pacheco, M.T., Pasqualoto, K.F., and de Souza, J.G. (2016). Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. *Biomed Pharmacother.* 77, 14–19.

Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., and Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp Parasitol.* 114, 40–46.

Corral-Rodríguez, M.Á., Macedo-Ribeiro, S., Pereira, P.J.B., and Fuentes-Prior, P. (2009). Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol.* 39, 579–595.

Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charloteaux, B., Decrem, Y., Prévot, P.P., Brossard, M., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2008). Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One.* 3, e1400.

Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., and Fikrig, E. (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathog.* 6, e1001205.

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., and Vanderplasschen, A. (2007). *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol.* 16, 155–166.

Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., and Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446.

Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., Frere, J.M., Feron, O., Dogné, J.M., Dessy, C., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med.* 206, 2381–2395.



De Groot, A.S., and Scott, D.W. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol.* 28, 482–490.

Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., and Brenner, C. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* 27, 285–299.

de Oliveira, A.D.S., Lima, L.G., Mariano-Oliveira, A., Machado, D.E., Nasciutti, L.E., Andersen, J.F., Petersen, L.C., Francischetti, I.M.B., and Monteiro, R.Q. (2012). Inhibition of tissue factor by Ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. *Thromb Res.* 130, 163–170.

Deruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira, B.R., Graham, G.J., Shaw, J.P., Wells, T.N.C., Teixeira, M.M., Power, C.A., and Proudfoot, A.E.I. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med.* 205, 2019–2031.

de Souza, J.G., Morais, K.L., Anglés-Cano, E., Bouffleur, P., de Mello, E.S., Maria, D.A., Origassa, C.S., de Campos Zampolli, H., Câmara, N.O., Berra, C.M., Bosch, R.V., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2016). Promising pharmacological profile of a Kunitz-type inhibitor in murine renal cell carcinoma model. *Oncotarget.* 7, 62255–62266.

Dinan, T.G. (1996). Serotonin: current understanding and the way forward. *Int Clin Psychopharmacol.* 11, 19–21.

Drewes, C.C., Dias, R.Y.S., Hebeda, C.B., Simons, S.M., Barreto, S.A., Ferreira, J.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., and Farsky, S.H.P. (2012). Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon.* 60, 333–340.

Drewes, C.C., Dias, R.Y., Branco, V.G., Cavalcante, M.F., Souza, J.G., Abdalla, D.S., Chudzinski-Tavassi, A.M., and Farsky, S.H. (2015). Post-transcriptional control of Amblyomin-X on secretion of vascular endothelial growth factor and expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Toxicon.* 101, 1–10.

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* *148*, 2207–2216.
- Faitová, J., Krekác, D., Hrstka, R. and Vojtěšek, B. (2006). Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett.* *11*, 488–505.
- Feldman, L., and Rouleau, C. (2002). Troponin I inhibits capillary endothelial cell proliferation by interaction with the cell's bFGF receptor. *Microvasc Res.* *63*, 41–49.
- Ferreira, B.R., and Silva, J.S. (1999). Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* *96*, 434–439.
- Ferreira, C.A., Da Silva Vaz, I., da Silva, S.S., Haag, K.L., Valenzuela, J.G, and Masuda, A. (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp Parasitol.* *101*, 25–34.
- Fields, W.S. (1991). The history of leeching and hirudin. *Haemostasis.* *21*, 3–10.
- Figueiredo, S.S., Iopes, S., Barboza, T., and de Sá, L. (2019). Preclinical dosimetric evaluation of Ixolaris labeled with <sup>99m</sup>Tc and translacional model. *Braz J Radiat Sci.* *7*.
- Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (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.
- Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2003). Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun.* *305*, 869–875.

Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost.* *91*, 886–898.

Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2005a). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thromb Haemost.* *94*, 167–174

Francischetti, I.M.B., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., and Ribeiro, J.M.C. (2005b). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* *35*, 1142–1161.

Francischetti, I.M.B., Sá-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., and Ribeiro, J.M.C. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.* *14*, 2051–2088.

Francischetti, I.M.B. (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon.* *56*, 1130–1144.

Frauenschuh, A., Power, C.A., Deruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M, Martin, T., Wells, T.N.C., and Proudfoot, A.E.I. (2007). Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J Biol Chem.* *282*, 27250–27258.

Fukumoto, S., Sakaguchi, T., You, M., Xuan, X., and Fujisaki, K. (2006). Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvasc Res.* *71*, 218–221.

Gan, Y., Shi, C., Inge, L., Hibner, M., Balducci, J., and Huang, Y. (2010). Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene.* *29*, 4947–4958.

Gao, X., Shi, L., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., and Zhou, J. (2011). Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *J Insect Physiol.* *57*, 339–343.

Garcia-Mata, R., Gao, Y.S., and Sztul, E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic*. *3*, 388–396.

Garg, R., Juncadella, I.J., Ramamoorthi, N., Ashish Ananthanarayanan, S.K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J.K., Fikrig, E., Yengo, C.M., and Anguita, J. (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol*. *177*, 6579–6583.

Geczy, A.F., Naughton, M.A., Clegg, J.B., and Hewetson, R.W. (1971). Esterases and a carbohydrate splitting enzyme in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Parasitol*. *57*, 437–438.

Gerotziafas, G.T., Papageorgiou, C., Hatmi, M., Samama, M.M., and Elalamy, I. (2008). Clinical studies with anticoagulants to improve survival in cancer patients. *Pathophysiol Haemost Thromb*. *36*, 204–211.

Gillespie, R.D., Dolan, M.C., Piesman, J., and 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.

Gomez, K., and McVey, J.H. (2006). Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci*. *11*, 1349–1359.

Graf, C., and Ruf, W. (2018). Tissue factor as a mediator of coagulation and signaling in cancer and chronic inflammation. *Thromb Res*. *164*, 143–147.

Hajnická, V., Vančová, I., Kocáková, P., Slovák, M., Gašperík, J., Sláviková, M., Hails, R.S., Labuda, M., and Nuttall, P.L. (2005). Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology*. *130*, 333–342.

Hajnická, V., Vančová-Štibrániová, I., Slovák, M., Kocáková, P., and Nuttall, P.A. (2011). Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int J Parasitol*. *41*, 213–223.

Halámková, J., Kiss, I., Tomášek, J., Pavlovský, Z., Tuček, Š., Penka, M. (2012). Význam urokinázy a jejích inhibitorů pro invazi a metastazování zhoubných nádorů. *Vnitřní lékařství*. 58, 129–134.

Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans.* 40, 1378–1382.

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

Herndon, T.M., Deisseroth, A., Kaminskas, E., Kane, R.C., Koti, K.M., Rothmann, M.D., Habtemariam, B., Bullock, J., Bray, J.D., Hawes, J., Palmby, T.R., Jee, J., Adams, W., Mahayni, H., Brown, J., Dorantes, A., Sridhara, R., Farrell, A.T., and Pazdur, R. (2013). U.s. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 19, 4559–4563.

Hidano, A., Konnai, S., Yamada, S., Githaka, N., Isezaki, M., Higuchi, H., Nagahata, H., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., and Ohahsi, K. (2014). Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* schulze tick. *Insect Mol Biol.* 23, 466–474.

Horak, I.G., Camicas, J.L., and Keirans, J.E. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol.* 28, 27–54.

Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R. (2017). *Základy imunologie*. 6. Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.

Hourcade, D.E., Akk, A.M., Mitchell, L.M., Zhou, H.F., Hauhart, R., and Pham, C.T. (2016). Anti-complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Mol Immunol.* 69, 62–69.

Hovius, J.W., de Jong, M.A., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B. (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine

expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* *4*, e31.

Ibelli, A.M., Kim, T.K., Hill, C.C., Lewis, L.A., Bakshi, M., Miller, S., Porter, L. and Mulenga, A. (2014). A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int J Parasitol.* *44*, 369–379.

Iqbal, A., Goldfeder, M.B., Marques-Porto, R., Asif, H., de Souza, J.G., Faria, F., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2017). Revisiting antithrombotic therapeutics; sculptin, a novel specific, competitive, reversible, scissile and tight binding inhibitor of thrombin. *Sci Rep.* *7*, 1431.

Islam, M.K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Alim, M.A., Huang, X., Hatta, T., and Fujisaki, K. (2009). The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog.* *5*, e1000497.

Israels, L.G. and Israels, E.D. (1999). Apoptosis. *Stem Cells.* *17*, 306–313.

Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., and Chinzei, Y. (2003). Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur J Biochem.* *270*, 1926–1934.

Iyer, J.K., Koh, C.Y., Kazimirova, M., Roller, L., Jobichen, C., Swaminathan, K., Mizuguchi, J., Iwanaga, S., Nuttall, P.A., Chan, M.Y., and Kini, R.M. (2017). Avathrin: a novel thrombin inhibitor derived from a multicopy precursor in the salivary glands of the ixodid tick, *Amblyomma variegatum*. *FASEB J.* *31*, 2981–2995.

Jablonka, W., Kotsyfakis, M., Mizurini, D.M., Monteiro, R.Q., Lukszo, J., Drake, S.K., Ribeiro, J.M.C., and Andersen, J.F. (2015). Identification and mechanistic analysis of a novel tick-derived inhibitor of thrombin. *PLoS One.* *10*, e0133991.

Jarosch, E., Lenk, U., and Sommer, T. (2003). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol.* *223*, 39–81.

Jarzabek, M.A., Sweeney, K.J., Evans, R.L., Jacobs, A.H., Stupp, R., O'Brien, D., Berger, M.S., Prehn, J.H., and Byrne, A.T. (2013). Molecular imaging in the development of a novel treatment paradigm for glioblastoma (GBM): an integrated multidisciplinary commentary. *Drug Discov Today*. *18*, 1052–1066.

Jaworski, D.C., Rosell, R., Coons, L.B., and Needham, G.R. (1992). Tick (Acari: Ixodidae) attachment cement and salivary gland cells contain similar immunoreactive polypeptides. *J Med Ent*. *29*, 305–309.

Jaworski, D.C., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M.T., and Needham, G.R. (1995). A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J Insect Physiol*. *41*, 369–375.

Jelinski, J.W. (2016). Painless hematophagy: the functional role of novel tick metalloproteases in pain suppression. Honors Theses. *401*.

Kaewhom, P., Stich, R.W., Needham, G.R., and Jittapalpong, S. (2008). Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. *Ann NY Acad Sci*. *1149*, 53–57.

Kane, R.C., Farrell, A.T., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2006). United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res*. *12*, 2955–2960.

Kara, E.E., Comerford, I., Fenix, K.A., Bastow, C.R., Gregor, C.E., McKenzie, D.R., and McColl, S.R. (2014). Tailored immune responses: novel effector helper T cell subsets in protective immunity. *PLoS Pathog*. *10*, e1003905.

Karczewski, J., Endris, R., and Connolly, T.M. (1994). Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem*. *269*, 6702–6708.

- Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., and Chinzei, Y. (2005). Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thromb Haemost.* 93, 359–367.
- Kazimírová, M., Dovinová, I., Rolníková, T., Tóthová, L., and Hunáková, L. (2006). Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. *Neuro Endocrinol Lett.* 27, 48–52.
- Kazimírová, M. (2008). Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. *Adv Arachnol Dev Biol.* 12, 281–296.
- Kazimírová, M., and Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 3, 43.
- Keller, P.M., Waxman, L., Arnold, B.A., Schultz, L.D., Condra, C., and Connolly, T.M. (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet-aggregation. *J Biol Chem.* 268, 5445–5449.
- Kern, B.E., Balcom, J.H., Antoniu, B.A., Warshaw, A.L., and Fernández-del Castillo, C. (2003). Troponin I peptide (Glu94-Leu123), a cartilage-derived angiogenesis inhibitor: *in vitro* and *in vivo* effects on human endothelial cells and on pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 7, 961–968.
- Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A.J., and Okubo, K. (2001). Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 20, 639–673.
- Koh, C.Y., Kazimirova, M., Trimnell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P.A., and Kini, R.M. (2007). Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *J Biol Chem.* 282, 29101–29113.
- Koh, C.Y., Kumar, S., Kazimirova, M., Nuttall, P.A., Radhakrishnan, U.P., Kim, S., Jagadeeswaran, P., Imamura, T., Mizuguchi, J., Iwanaga, S., Swaminathan, K., and Kini, R.M. (2011). Crystal structure of thrombin in complex with S-variegin: insights of a novel mechanism of inhibition and design of tunable thrombin inhibitors. *PLoS One.* 6, e26367.



Kordiš, D., and Turk, V. (2009). Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evol Biol.* 9, 266.

Kos, J., Stabuc, B., Schweiger, A., Krasovec, M., Cimerman, N., Kopitar-Jerala, N., and Vrhovec, I. (1997). Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 3, 1815–1822.

Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M.B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J.H., Kotsyfakis, M., and Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics.* 128, 58–68.

Kotál, J., Stergiou, N., Buša, M., Chlastáková, A., Beránková, Z., Řezáčová, P., Langhansová, H., Schwarz, A., Calvo, E., Kopecký, J., Mareš, M., Schmitt, E., Chmelař, J., and Kotsyfakis, M. (2019). The structure and function of Iristatin, a novel immunosuppressive tick salivary cystatin. *Cell Mol Life Sci.* 76, 2003–2013.

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

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

Kuhn, N., Schmidt, C.Q., Schlapschy, M., and Skerra, A. (2016). PASylated coversin, a C5-specific complement inhibitor with extended pharmacokinetics, shows enhanced anti-hemolytic activity *in vitro*. *Bioconjug Chem.* 27, 2359–2371.

Leavis, P.C., and Gergely, J. (1984). Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem.* 16, 235–305.

Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., and Godfroid, E. (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J Biol Chem.* 277, 10083–10089.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13, 62–70.

Lichtenstein, F., Iqbal, A., de Lima Will, S.E.A., Bosch, R.V., DeOcesano-Pereira, C., Goldfeder, M.B., Chammas, R., Trufen, C.E.M., Morais, K.L.P., de Souza, J.G., Natalino, R.J.M., de Azevedo, I.J., Nishiyama Junior, M.Y., Oliveira, U., Alves, F.I.A., Araujo, J.M., Lobba, A.R.M., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2020). Modulation of stress and immune response by Amblyomin-X results in tumor cell death in a horse melanoma model. *Sci Rep.* 10, 6388.

Lu, Z., and Hunter, T. (2010). Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle.* 9, 2342–2352.

Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B.M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P., and Pereira, P.J.B. (2008). Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PloS One.* 3, e1624.

Mans, B.J., Gaspar, A.R.M.D., Louw, A.I., and Neitz, A.W.H. (1998a). Purification and characterisation of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comp Biochem and Phys.* 120, 617–624.

Mans, B.J., Gaspar, A.R.M.D., Louw, A.I., and Neitz, A.W.H. (1998b). Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol.* 22, 353–366.

Mans, B.J., Coetzee, J., Louw, A.I., Gaspar, A.R., and Neitz, A.W. (2000). Dissaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol.* 24, 271–282.

Mans, B.J., Louw, A.I., and Neitz, A.W. (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J Biol Chem.* 277, 21371–21378.

Mans, B.J., Louw, A.I., and Neitz, A.W. (2003). The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Mol Biol Evol.* 20, 1158–1167.

Mans, B.J., and Ribeiro, J.M.C. (2008). Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem Mol Biol.* 38, 841–852.

Maria, D.A., de Souza, J.G., Morais, K.L.P., Berra, C.M., Zampolli, H. de C., Demasi, M., Simons, S.M., de Freitas Saito, R., Chammas, R., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2013). A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. *Invest New Drugs.* 31, 493–505.

Maria, D.A., Will, S.E.A.L., Bosch, R.V., Souza, J.G., Sciani, J.M., Goldfeder, M.B., Rondon, G.G., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2019). Preclinical evaluation of Amblyomin-X, a Kunitz-type protease inhibitor with antitumor activity. *Toxicol Rep.* 6, 51–63.

Matthijs, M.J., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N.M., Li, Y.I., Nunn, M.A., Elmlund, H., and Lea, S.M. (2016). Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat Struct Mol Biol.* 23, 378–386.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91, 295–298.

Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., and Brossard, M. (2001). Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* 23, 61–69.

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesacli, N., Nakamura, K., and Opas, M. (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 344, 281–292.

Monteiro, R.Q., Rezaie, A.R., Ribeiro, J.M., and Francischetti, I.M.B. (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J.* 387, 871–877.

- Monteiro, R.Q., Rezaie, A.R., Bae, J.S., Calvo, E., Andersen, J.F., and Francischetti, I.M.B. (2008). Ixolaris binding to factor X reveals a precursor state of factor Xa heparin-binding exosite. *Protein Science*. *17*, 146–153.
- Morais, K.L.P., Pacheco, M.T.F., Berra, C.M., Bosch, R.V., Sciani, J.M., Chammas, R., de Freitas Saito, R., Iqbal, A., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2016). Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. *Mol Cell Biochem*. *415*, 119–131.
- Moses, M.A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C.A., Ghazizadeh, V., Lane, W.S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T., and Langer, R. (1999). Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. *96*, 2645–2650.
- Motoyashiki, T., Tu, A.T., Ayimov, D.A., and Ibragim, K. (2003). Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. *Thromb Res*. *110*, 235–241.
- Murfin, K.E., and Fikrig, E. (2017). Tick bioactive molecules as novel therapeutics: beyond vaccine targets. *Front Cell Infect Microbiol*. *7*, 222.
- Murphy, K., Janeway, C.A., and Mowat, A. (2012). *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science.
- Nakajima, C., Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Nishikado, H., Ohashi, K., and Onuma, M. (2006). A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *J Vet Med Sci*. *68*, 447–452.
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello M., and Fikrig, E. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol*. *11*, 641–650.
- Nasser, M.W., Ahirwar, D.K., and Ganju, R.K. (2016). RAGE: A novel target for breast cancer growth and metastasis. *Oncoscience*. *3*, 52–53.

Nava, S., Guglielmo, A.A., and Mangold, A.J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci.* *14*, 2857–2877.

Nazareth, R.A., Tomaz, L.S., Ortiz-Costa, S., Atella, G.C., Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M.B., and Monteiro, R.Q. (2006). Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost.* *96*, 7–13.

Nienaber, J., Gaspar, A.R.M., and Neitz, A.W.H. (1999). Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Parasitol.* *93*, 82–91.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* *41*, 49–61.

Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., and Nuttall, P.A. (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Immunol.* *174*, 2084–2091.

Nuttall, P.A. (2018). Wonders of tick saliva. *Ticks and Tick-borne Diseases.* *10*, 470–481.

Oliveira, C.J., Sa-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J.S., de Miranda Santos, I.K.F., Ribeiro, J.C.M., and Ferreira, B.R. (2011). Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J Biol Chem.* *286*, 10960–10969.

Pacheco, M.T., Morais, K.L., Berra, C.M., Demasi, M., Sciani, J.M., Branco, V.G., Bosch, R.V., Iqbal, A., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2016). Specific role of cytoplasmic dynein in the mechanism of action of an antitumor molecule, Amblyomin-X. *Exp Cell Res.* *340*, 248–258.

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

Paesen, G.C., Adams, P.L., Nuttall, P.A., and Stuart, D.I. (2000). Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochim Biophys Acta*. 1482, 92–101.

Paesen, G.C., Siebold, C., Harlos, K., Peacey, M.F., Nuttall, P.A., and Stuart, D.I. (2007). A tick protein with a modified Kunitz fold inhibits human tryptase. *J Mol Biol*. 368, 1172–1186.

Páleníková, J., Lieskovská, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Chmelař, J., and Kopecký, J. (2015). *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway. *Infect Immun*. 83, 1949–1956.

Pemberton, R.W. (1999). Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 65, 207–216.

Pike, S.E., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K.D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Atreya, C.D., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., and Tosato, G. (1999). Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*. 94, 2461–2468.

Pireaux, V., Tassignon, J., Demoulin, S., Derochette, S., Borenstein, N., Ente, A., Fiette, L., Douxfils, J., Lancellotti, P., Guyaux, M., and Godfroid, E. (2019). Anticoagulation with an inhibitor of factors XIa and XIIa during cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol*. 74, 2178–2189.

Poole, N.M., Nyindodo-Ogari, L., Kramer, C., Coons, L.B., and Cole, J.A. (2013). Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 4, 120–127.

Preston, S.G., Majtán, J., Kouremenou, C., Rysnik, O., Burger, L.F., Cabezas Cruz, A., Guzman, M.C., Nunn, M.A., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., and Austyn, J.M. (2013). Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS Pathog*. 9, e1003450.

Prevot, P.P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., Adam, B., Brossard, M., Brasseur, R., Boudjeltia, K.Z., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2009). Exosites mediate

the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. FEBS J. 276, 3235–3246.

Price, J.T., Bonovich, M.T., and Kohn, E.C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. Crit Rev Biochem Mol Biol. 32, 175–253.

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., and Fikrig, E. (2005). The lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature. 436, 573–577.

Ramírez-Toloza, G., Aguilar-Guzmán, L., Valck, C., Abello, P., and Ferreira, A. (2015). Is it all that bad when living with an intracellular protozoan? The role of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in angiogenesis and tumor growth. Front Oncol. 4, 382.

Rao, L.V., and Pendurthi, U.R. (2005). Tissue factor-factor VIIa signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25, 47–56.

Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1990). Evolution of proteins of the cystatin superfamily. J Mol Evol. 30, 60–71.

Ribeiro, J.M.C., Makoul, G., Levine, J., Robinson, D., and Spielman, A. (1985). Antihemostatic, autoinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick *Ixodes dammini*. J Exp Med. 161, 332–344.

Ribeiro, J.M.C., Makoul, G.T., and Robinson, D.R. (1988). *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. J Parasitol. 74, 1068–1069.

Ribeiro, J.M.C., Endris, T.M., and Endris, R. (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. Comp Biochem and Phys. 100, 109–112.

Ribeiro, J.M.C., and Mather, T.N. (1998). *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. Exp Parasitol. 89, 213–221.

Rieger, H., and Welter, M. (2015). Integrative models of vascular remodeling during tumor growth. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 7, 113–129.

Rosiñol, L., Montoto, S., Cibeira, M.T., and Bladé, J. (2005). Bortezomib-induced severe hepatitis in multiple myeloma: a case report. *Arch Intern Med.* 165, 464–465.

Rother, K., Till, G.O., and Hansch, G.M. (1998). *The complement system.* 2nd ed., Berlin: Springer.

Roversi, P., Johnson, S., Preston, S.G., Nunn, M.A., Paesen, G.C., Austyn, J.M., Nuttall, P.A., and Lea, S.M. (2017). Structural basis of cholesterol binding by a novel clade of dendritic cell modulators from ticks. *Sci Rep.* 7, 16057.

Rumbaut, R.E., and Thiagarajan P. (2010). *Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.

Salamone, M., Carfi Pavia, F., and Ghersi, G. (2016). Proteolytic enzymes clustered in specialized plasma-membrane domains drive endothelial cells migration. *PloS One.* 11, e0154709.

Sangamnatdej, S., Paesen, G.C., and Slovak, M. (2002). A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol Biol.* 11, 79–86.

Satoh, M., Oguro, R., Yamanaka, C., Takada, K., Matsuura, Y., Akiba, T., Aotsuka, N., Tani, Y., and Wakita, H. (2011). Clinical assessment of bortezomib for multiple myeloma in comparison with thalidomide. *J Pharm Pharm Sci.* 14, 78–89.

Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* 1, 4–17.

Sauer, J.R. (1977). Acarine salivary glands –physiological relationships. *J Med Ent.* 14, 1–9.  
Sá-Nunes, A., Báfica, A., Lucas, D.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., and Francischetti, I.M.B. (2007). Prostaglandin E2 is a major inhibitor



of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol.* *179*, 1497–1505.

Sá-Nunes, A., Báfica, A., Antonelli, L.R., Young Choi, E., Francischetti, I.M.B., Andersen, J.F., Shi, G.P., Chavakis, T., Ribeiro, J.M.C., and Kotsyfakis, M. (2009). The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J Immunol.* *182*, 7422–7429.

Schechter, M.E., Andrade, B.B., He, T., Richter, G.H., Tosh, K.W., Policicchio, B.B., Singh, A., Raehtz, K.D., Sheikh, V., Ma, D., Brocca-Cofano, E., Apetrei, C., Tracy, R., Ribeiro, R.M., Sher, A., Francischetti, I.M.B., Pandrea, I., and Sereti, I. (2017). Inflammatory monocytes expressing tissue factor drive SIV and HIV coagulopathy. *Sci Transl Med.* *9*, 5441.

Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., and Skerra, A. (2013). PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.* *26*, 489–501.

Schlehuber, S., and Skerra, A. (2005). Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to “anticalins”. *Drug Discov Today.* *10*, 23–33.

Schmidt, M.C.B., Morais, K.L.P., Almeida, M.E.S., Iqbal, A., Goldfeder, M.B., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2020). Amblyomin-X, a recombinant Kunitz-type inhibitor, regulates cell adhesion and migration of human tumor cells. *Cell Adh Migr.* *14*, 129–138.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* *74*, 739–789.

Schweiger, A., Christensen, I.J., Nielsen, H.J., Sørensen, S., Brüner, N., and Kos, J. (2004). Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* *19*, 289–294.

Shibuya, M. (2014). VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther.* *22*, 1–9.

Simons, S.M., Júnior, P.L., Faria, F., Batista, I.F., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2011). The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in

compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomed Pharmacother.* *65*, 443–450.

Smith, H.W., and Marshall, C.J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *11*, 23–36.

Soares, T.S., Oliveira, F., Torquato, R.J.S., Sasaki, S.D., Araujo, M.S., Paschoalin, T., and Tanaka, A.S. (2016). BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation. *Vet Parasitol.* *219*, 44–52.

Sonenshine, D.E., and Roe, R.M. (2014). *Biology of ticks*. 2nd ed., New York: Oxford University Press.

Soriano, M.E., and Scorrano, L. (2010) The interplay between BCL-2 family proteins and mitochondrial morphology in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* *687*, 97–114.

Sousa, A.C.P., Szabó, M.P.J., Oliveira, C.J.F., and Silva, M.J.B. (2015). Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. *Toxicon.* *102*, 69–73.

Sousa, A.C.P., Oliveira, C.J.F., Szabó, M.P.J., and Silva, M.J.B. (2018). Anti-neoplastic activity of *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* and *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva on breast tumor cell lines. *Toxicon.* *148*, 165–171.

Stabin, M.G. (2017). *The practice of internal dosimetry in nuclear dosimetry*. Boca Raton (FL): CRC Press, Taylor & Francis Group.

Stappenbeck, T.S., and Miyoshi, H. (2009). The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science.* *324*, 1666–1669.

Sudhan, D.R., Pambo, C., Rice, L., and Siemann, D.W. (2016). Cathepsin L inactivation leads to multimodal inhibition of prostate cancer cell dissemination in a preclinical bone metastasis model. *Int J Cancer.* *138*, 2665–2677.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*

Suppan, J., Engel, B., Marchetti-Deschmann, M., and Nürnberger, S. (2017). Tick attachment cement – reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biol Rev.* *93*, 1056–1076.

Šimo, L., Kazimírová, M., Richardson, J., and Bonnet, S.I. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* *7*, 281.

Štibrániová, I., Bartíková, P., Holíková, V., and Kazimírová, M. (2019). Deciphering biological processes at the tick-host interface opens new strategies for treatment of human diseases. *Front Physiol.* *10*, 830.

Tambourgi, D.V., and van den Berg, C.W. (2014). Animal venoms/toxins and the complement system. *Mol Immunol.* *61*, 153–162.

Tanaka, A.S., Andreotti, R., Gomes, A., Torquato, R.J., Sampaio, M.U., and Sampaio, C.A. (1999). A double headed serine proteinase inhibitor – human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology.* *45*, 171–177.

Tian, Y., Yedid, G., Yan, X., Fang, M., Mo, G., Chen, R., Fang, M., Yedid, G., and Yan, X. (2016). An immunosuppressant peptide from the hard tick *Amblyomma variegatum*. *Toxins.* *8*, 133.

Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T.A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *3*, 246–255.

Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., and de Silva, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol.* *16*, 469–479.

Valdés, J.J., Schwarz, A., Cabeza de Vaca, I., Calvo, E., Pedra, J.H.F., Guallar, V., and Kotsyfakis, M. (2013). Tryptogalinin is a tick Kunitz serine protease inhibitor with a unique intrinsic disorder. *PLoS One*. 8, e62562.

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

Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M. (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol*. 205, 2843–2864.

van der Locht, A., Stubbs, M.T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., and Huber, R. (1996). The ornithodorin thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO Journal*. 15, 6011–6017.

Ventura, J.S., Faria, F., Batista, I.F., Simons, S.M., Oliveira, D.G., Morais, K.L., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2013). A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 67, 192–196.

Veronese, F.M., and Mero, A. (2008). The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*. 22, 315–329.

Volf, P. a Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-008-9.

Wang, H., and Nuttall, P.A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol Life Sci*. 56, 286–295.

Wang, X., Coons, L.B., Taylor, D.B., Stevens, S.E., and Gartner, T.K. (1996). Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J Biol Chem*. 271, 17785–17790.

- Wang, Y., Zhou, Y., Gong, H., Cao, J., Zhang, H., Li, X., and Zhou, J. (2015). Functional characterization of a cystatin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Parasit Vectors*. *8*, 140.
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., and Vlasuk, G.P. (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*. *248*, 593–596.
- Waxman, L., and Connolly, T.M. (1993). Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem*. *268*, 5445–5449.
- Wei, N., Lin, Z., Xu, Z., Cao, J., Zhou, Y., Zhang, H., Gong, H., Zhou, J., and Li, G. (2018). A tick cysteine protease inhibitor RHcyst-1 exhibits antitumor potential. *Cell Physiol Biochem*. *46*, 2385–2400.
- Wei, N., Lin, Z., Xu, Z., Gong, H., Zhang, H., Zhou, Y., Cao, J., Li, G., and Zhou, J. (2019). Immunosuppressive effects of tick protein RHcyst-1 on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasit Vectors*. *12*, 169.
- Weston-Davies, W.H., Nunn, M.A., Pinto, F., Mackie, J.I., Richards, S.J., Machin, S.J., Prudo, R., and Hillmen, P. (2014). Clinical and immunological characterisation of coversin, a novel small protein inhibitor of complement C5 with potential as a therapeutic agent in PNH and other complement mediated disorders. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, H., Yang, H., Ma, D., Li, J., Li, D., Lai, R., and Yu, H. (2010). Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *J Biol Chem*. *285*, 16606–16613.
- Wu, T., and Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*. *387*, 61–68.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*. *1773*, 642–652.

- Yeh, C.H., Fredenburgh, J.C., and Weitz, J.I. (2012). Oral direct factor Xa inhibitors. *Circ Res.* *111*, 1069–1078.
- Yoshikai, Y. (2001). Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis.* *14*, 257–263.
- You, M., Xuan, X., Tsuji, N., Kamio, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., and Fujisaki, K. (2001). Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol.* *32*, 67–73.
- Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J., and Lai, R. (2006). A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochem Biophys Res Commun.* *343*, 585–590.
- Zalpour, A., Kroll, M.H., Afshar-Kharghan, V., Yusuf, S.W., and Escalante, C. (2011). Role of factor Xa inhibitors in cancer-associated thrombosis: any new data? *Adv Hematol.* *2011*, 196135.
- Zavasnik-Bergant, T. (2008). Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front Biosci.* *13*, 4625–4637.
- Zhang, J., Shridhar, R., Dai, Q., Song, J., Barlow, S.C., Yin, L., Sloane, B.F., Miller, F.R., Meschonat, C., Li, B.D., Abreo, F., and Keppler, D. (2004). Cystatin M: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. *Cancer Res.* *64*, 6957–6964.
- Zhu, K., Bowman, A.S., Dillwith, J.W., and Sauer, J.R. (1998). Phospholipase A2 activity in salivary glands and saliva of the lone star tick (Acari: Ixodidae) during tick feeding. *J Med Ent.* *35*, 500–504.