

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Pokus o charakterizaci proteinu vázajícího TNF – α
ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus***

Diplomová práce

Bc. Markéta Rezková

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2017

Rezková, M., 2017: Pokus o charakterizaci proteinu vázajícího TNF – α ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*. [An attempt to characterize TNF – α binding protein in *Ixodes ricinus* saliva. Mgr. Thesis, in Czech] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Tumor necrosis factor α is one of the most important pro-inflammatory cytokines of the innate immune system. We tested several species of ticks for anti-tumour necrosis factor- α activity in this study. The specific activity was proved for *Ixodes ricinus* saliva and several other species. We also tested dynamics of this specific activity in *Ixodes ricinus* saliva. The highest effect of saliva appears at the end of feeding period. Although we detected an inhibitory effect, none TNF-binding molecule has been identified so far. Our results excluded enzymatic activity cleaving TNF molecule.

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Markéta Rezková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli ke vzniku této práce. V první řadě bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za vedení práce, odborné rady a vstřícnost. Dále děkuji Janu Erhartovi za poskytnutí materiálu do experimentů a Ing. Gabriele Loosové za ochotu a čas při práci s klišťaty. Děkuji RNDr. Janě Páleníkové, PhD., Bc. Dominice Veselé a Mgr. Jaroslavě Lieskovské, PhD za cenné rady a připomínky v metodických postupech. V neposlední řadě bych poděkovala svému příteli a rodině, která mi byla oporou v průběhu celého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Klíšťata	1
1.2. Obsah slin klíšťat	1
1.3. Imunomodulační mechanismy	3
1.4. Slinami aktivovaný přenos.....	4
1.5. Charakteristika zkoumaných druhů klíšťat.....	5
1.5.1. <i>Ixodes ricinus</i>	5
1.5.2. <i>Ixodes scapularis</i>	6
1.5.3. <i>Ixodes hexagonus</i>	7
1.5.4. <i>Ixodes persulcatus</i>	8
1.5.5. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
1.5.6. <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	10
1.5.7. <i>Rhipicephalus pulchellus</i>	11
1.5.8. <i>Dermacentor marginatus</i>	12
1.5.9. <i>Dermacentor reticulatus</i>	13
1.5.10. <i>Haemaphysalis concinna</i>	14
1.5.11. <i>Amblyomma americanum</i>	15
1.6. Tumor necrosis factor alfa	16
1.7. Receptory TNFR1 a TNFR2.....	17
1.8. Inhibice TNF- α	20
1.8.1. Vazebný protein.....	21
1.8.2. Enzymatické štěpení	22
2. Cíle práce.....	23
3. Materiál a metody.....	24
3.2. Příprava vzorků.....	25

3.3. Cytokinová ELISA	26
3.4. WESTERN BLOTTING.....	27
3.5. Statistické zpracování dat	28
4. Výsledky.....	29
5. Diskuze.....	41
6. Závěr.....	44
7. Přehled použitých zkratk	45
8. Literatura	47
9. Obrázky	55

1. Úvod

1.1. Klíšťata

Klíšťata jsou globálně rozšíření hematofágní ektoparazité parazitující na savcích, ptácích, plazech a obojživelnících. Z medicínského hlediska představují významné vektory pro řadu patogenů způsobujících vážná onemocnění obratlovců včetně člověka, a proto je důležitý neustálý výzkum v této oblasti.

Taxonomicky lze klíšťata zařadit do říše živočichů (*Animalia*), kmene členovců (*Arthropoda*), podkmene klepítkatců (*Chelicerata*), třídy pavoukoců (*Arachnida*), podtřídy roztočů (*Acari*), řádu *Parasitiformes* a podřádu klíšťatovců (*Ixodida*), kteří se dále dělí na čeledi *Nuttalliellidae*, klíšťákovití (*Argasidae*) a klíšťatovití (*Ixodidae*). Nejvíce zástupců nalezneme v čeledi *Ixodidae*, s 12 rody a 720 druhy, následuje čeleď *Argasidae* se 4 rody a 186 druhy a čeleď *Nuttalliellidae*, kam patří jediný druh *Nuttalliella namaqua* (Bowman et al., 2008).

Jiný způsob dělení rozlišuje tvrdá a měkká klíšťata. Tvrdá představují zástupci z čeledi *Ixodidae*, která mají charakteristický sklerotizovaný hřbetní štítek (scutum) a měkká z čeledi *Argasidae*, pokrytá kožovitým obalem (integument). Tvrdá a měkká klíšťata se kromě morfologie odlišují také ve způsobu získání potravy. Zástupci čeledi *Argasidae* mají poměrně jednoduchou strategii. Na hostiteli sají opakovaně poměrně krátkou dobu v řádu minut až hodin a svojí tělesnou hmotnost dokáží zvýšit 2krát až 10krát, přičemž přebytečnou tekutinu odvádí kyčelními (koxálními) žlázami (Mans et al., 2011). Naproti tomu klíšťata z čeledi *Ixodidae* v každém vývojovém stádiu sají několik dní až týdnů a tělesnou hmotnost dokáží zvýšit až 100krát, nadbytečnou vodu z krve vylučují zpět do hostitele slinnými žlázami (Goodman et al., 2005).

1.2. Obsah slin klíšťat

Sliny se tvoří ve slinných žlázách, které jsou uloženy v přední části těla klíšťete. Slinné žlázy jsou párovým orgánem, který tvarem připomíná dva hrozny a během sání vyplňuje velkou část

těla. Slinnými vývody ze žláz se tekutý obsah dostává až do salivaria mezi chelicerami a hypostomem. Odtud už je sekretovaný chelicerami přímo do hostitele.

Produkce slin nastane ihned po přísátí. Zpočátku v menší míře, ale postupem času, se zvětšujícími se žlázami přibývá i slin. Aby se zesílilo připojení k hostiteli, klíště produkuje tzv. cement, který funguje jako pojidlo. Tak se pevně ukotví ústní aparát v ráně a odolává i mechanickému poškození (Mareš et. Kopáček, 2008).

Brzy po průniku se tkáň hostitele setkává s jednotlivými komponentami slin. Ty jsou tvořené z většiny vodou, ionty a bioaktivními molekulami (zejména proteiny a lipidy). Proteiny a lipidy plní různou funkci, ale komplexně jako celek omezují hostitelovu obranu reakci. Bohužel jen u malého procenta molekul známe jejich povahu a funkci. Obecně se zde nachází enzymy, inhibitory enzymů, antagonisté histaminu, antihemostatické, protizánětlivé a imunomodulační faktory (Anderson et. Valenzuela, 2008).

Poranění kůže a místních cévek aktivuje hemostázu, která má tři složky – vazokonstrikce, agregace destiček a srážení krve. Proti všem si klíšťa dokázala vytvořit strategii! K zajištění dostatečného lokálního průtoku krve jsou ve slinách vazodilatační molekuly – prostacyklin a ve velké míře prostaglandin E2. K zamezení koagulace a funkce destiček působí proteiny proti trombinu, faktoru X a tkáňovému faktoru a látky podporující fibrinolýzu. Dále je zde apyráza, zamezující adhezi a agregaci destiček a mnoho specifických proteinů zaměřených na dílčí děje koagulace (Mareš et. Kopáček, 2008).

Po úspěšném omezení hemostázy přichází na řadu zánět jako součást imunitní odpovědi. Jde o složitý proces, s množstvím zúčastněných buněk a interakcí. Mezi hodně diskutované molekuly s protizánětlivým účinkem patří především cystatiny – inhibitory cysteinových proteáz, serpiny – inhibitory serinových proteáz (Kotsyfakis et al., 2006), kinázy a lipokaliny vázající histamin (Ribeiro et. Mather, 1998), inhibitory komplementu a další.

V imunitní reakci proti klíšťatům hrají významnou úlohu cytokiny. U zdravého jedince jsou nepostradatelné v regulaci buněčné a humorální odpovědi, a proto bylo pro klíště nezbytné vytvořit strategii narušující cytokinovou imunoregulaci. V sekretovaných slinách jsou proteiny blokující jak produkci cytokinů, tak samotné cytokiny. Vzájemný poměr produkovaných cytokinů Th1 a Th2 se narušuje a ve výsledku jsou potlačeny produkty Th1 subpopulace. Zvyšuje se hladina IL-4 a IL-10 a převládne stimulace B lymfocytů, potažmo

produkce protilátek (Mareš et. Kopáček, 2008). Naopak množství IFN- γ , IL-2, TNF- α a IL-6 klesá, a tak i buněčná odpověď. Polarizace směrem k Th2 lymfocytům je tedy dalším příkladem vytvoření příhodnějších podmínek pro úspěšné sání klíštěte (Kubeš et al., 1994).

Expresí bioaktivních molekul se mění během sání. Na počátku, ve fázi pomalého sání jsou ve slinách jiné molekuly (popř. v jiném poměru) než ve fázi rychlého sání (Nuttal & Labuda, 2004). Tím je značně ztížený jejich výzkum, který by do budoucna mohl přinést pokrok v léčbě autoimunit, hemostatických poruch nebo nádorů.

1.3. Imunomodulační mechanismy

K prvnímu kontaktu s hostitelem dojde na tělním povrchu, kdy klíště pronikne pomocí sacího orgánu (hypostomu) kůží. Při tomto procesu dojde k poškození buněk epidermis, dermis a místních cévek a vytvoření hemostatické a imunitní odpovědi hostitele. Klíšťata, ale i další krev sající parazité si proto ve snaze uniknout před obrannými mechanismy hostitele vyvinuli řadu účinných látek potlačujících některé tyto mechanismy (Anderson & Valenzuela, 2008).

Na počáteční anatomické poškození a přítomnost cizích molekul hostitel reaguje nespecifickou imunitní odpovědí. V místě vpichu ihned po přisátí klíštěte, je pro parazita důležité zamezit pocitu svědění a bolesti, které by mohly odhalit jeho přítomnost. Proto se do rány jako jedny z prvních dostávají látky s antihistaminovým účinkem, jinak by mohlo dojít k odtržení klíštěte od hostitele. Rozvíjí se zánětlivá reakce a lokálně dochází k infiltraci různých populací leukocytů. V této časné fázi je potlačena aktivita makrofágů, NK buněk, neutrofilů, produkce NO makrofágy, alternativní cesta komplementu a fagocytóza (Kopecký a Kuthejlová, 1998). Konkrétním příkladem jsou sliny z klíštěte *Ixodes scapularis* zamezující vazbě C3b a C5b složek komplementu na povrch buněk a tím se blokuje aktivace alternativní cesty komplementu (Ribeiro 1987). Stejně účinně působí sliny z tohoto druhu proti neutrofilům a to tak, že nemohou agregovat ani produkovat superoxidový anion (Ribeiro et al., 1990). Funkci NK buněk, potažmo produkci IFN- γ suprimuje SGE z klíštěte *Dermacentor reticulatus*, výsledkem je narušení rovnováhy cytokinů uvolněných Th1 a Th2 lymfocyty (Kubeš et al., 1994).

V pozdější fázi sání, kdy se uplatňuje specifická imunita, se imunosuprese zaměřuje proti T i B lymfocytům, přičemž omezuje jejich funkci díky neekvivalentní odpovědi na proliferační stimuly (Gillespie et al., 2001). Příkladem takové inhibice je protein Da-p36 objevený u klíštěte *Dermacentor andersoni*, který zabraňuje v dělení mitogenem stimulovaným T lymfocytům (Bergman et al., 2000). Protein BIP izolovaný z klíštěte *Ixodes ricinus* naopak inhibuje stimulované B lymfocyty (Hannier et al., 2004).

Pro úplnost modulace zánětlivé odpovědi je nutné zmínit evasiny – proteiny ze slin klíšťat, které vážou chemokiny (malé peptidy s chemotaktickým a aktivačním účinkem na leukocyty) (Déruaz et al., 2008). Tyto protizánětlivé vazebné proteiny byly prvně objeveny u klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* a zatím známe 4 zástupce (Frauenschu et al., 2007).

1.4. Slinami aktivovaný přenos

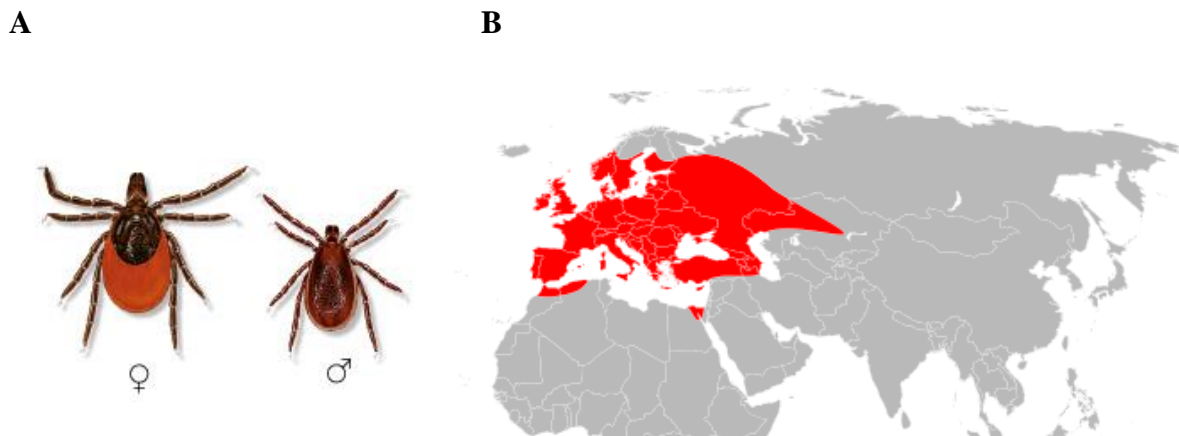
Výše popsané imunomodulační mechanismy jsou výhodné nejen pro parazita, ale dokonce jsou využívány některými patogeny, jako bakteriemi, viry a protozoálními parazity. V 90. letech 20. století byl na základě poznatků o způsobu šíření patogenů zaveden pojem SAT (saliva-activated transmission). V podstatě se jedná o usnadnění šíření patogenů ze slin vektora do těla hostitele vlivem potlačené imunitní reakce. Prvně byl jev pozorován u viru Thogoto (Jones et al., 1989), později také u viru klíšťové encefalidity, spirochét lymeské boreliózy (Nuttall et al., 1999) atd. Dokonce bylo zjištěno, že se tyto SAT faktory vzájemně odlišují v závislosti na druhu vektora, patogena i hostitele (Nuttall & Labuda, 2004). Zvláštním jevem je přítomnost SAT faktorů pouze ve slinách klíštěte sajícího několik dnů nikoliv u nenasátého jedince (Nuttall & Labuda, 2004).

Kromě přenosu patogena na hostitele, se sliny podílí na jeho šíření v klíštěcí populaci. Vzhledem k tomu, že zvířata bývají mnohdy napadena větším množstvím parazitů (klíšťat), snadno dojde k nevíremickému přenosu na doposud neinfikované klíště, přičemž v krvi hostitele virus není detekován (Jones et al., 1992).

1.5. Charakteristika zkoumaných druhů klíšťat

Pro účely diplomové práce bylo vybráno 11 druhů tvrdých klíšťat, u kterých byla zkoumána anti-TNF α aktivita. Níže je u každého z nich stručný popis životní strategie a ekologie.

1.5.1. *Ixodes ricinus*



Obr. 1: *Ixodes ricinus* (A) (www.scalibor.cz); výskyt (B) (www.wikipedia.org).

Ixodes ricinus neboli klíště obecné (obr. 1A) je jedním z nejběžnějších druhů klíšťat v Evropě (obr. 1B) (Medlock a kol. 2013). Je rozšířené od jižního Portugalska až po Norsko a Rusko, kde parazitují nižší vývojová stádia na ptácích, menších savcích, plazech a dospělé samice zpravidla na větších obratlovcích (Goodman et al, 2005). Během vývojového cyklu, který trvá 2-3 roky v závislosti na konkrétních podmínkách klíště vystřídá stádium larvy, nymfy a dospělého (Goodman et al, 2005). V každém z těchto období parazituje na jednom hostiteli v řádu několika dní a po dokončení stádia odpadá a prodělá metamorfózu; jedná se o tzv. tříhostitelský životní cyklus. V našich podmínkách je běžné, že převlékání nastává v průběhu léta, a tak během jara a podzimu nacházíme více prisátých jedinců. Dospělí samci potravu nepřijímají, pouze oplodní samice v čase, kdy sama saje. Oplodněná a plně nasátá samice odpadá, aby nakladla vajíčka (1000 až 3000 ve snůšce), z kterých se později stanou larvy, záhy přitom hyne (Gray 1998).

Ixodes ricinus vyhledává dostatečně vlhká místa, jako jsou listnaté a jehličnaté lesy, louky, pastviny a parky s relativní vlhkostí vzduchu okolo 80 % (Medlock a kol. 2013). Při lovu

aktivně vyčkává na vegetaci s doširoka rozevřenými předními končetinami. V této pozici vnímá přítomnost hostitele díky specializovanému Hallerovu orgánu, který je citlivý na vydechovaný oxid uhličitý, teplotu a tlak (Medlock et al., 2013).

Ixodes ricinus napadá i větší obratlovce včetně člověka. Stává se tak účinným vektorem pro přenos řady patogenů způsobujících vážná onemocnění například lymeskou boreliózu, klíšťovou encefalitidu, lidskou granulocytární anaplazmózu, tularémii nebo babeziózu (Medlock et al., 2013).

1.5.2. *Ixodes scapularis*

A



B



Obr. 1 : *Ixodes scapularis* (A) (www.wikipedia.org); výskyt (B) (www.wikipedia.org).

Ixodes scapularis (obr. 2A) parazituje zejména na jelenci běloocasém, ale ve stádiu larvy nebo nymfy může napadat myši, ještěrky nebo ptáky (Aliota et al., 2014; Levine et al., 1997). Areál výskytu *Ixodes scapularis* (obr. 2B) se shoduje s habitatem jelence běloocasého, nejběžnějšího hostitele, podle kterého v anglické literatuře nese jméno „deer tick“. *Ixodes scapularis* prodělává tříhostitelský cyklus, kdy každé stádium potřebuje jiného hostitele. Dospělá samice saje přibližně 4 až 5 dní, poté odpadne a přezimuje. Na jaře počátkem března naklade stovky až tisíce vajíček. *Ixodes scapularis* je poměrně vytrvalý druh, nevdá mu teploty ani okolo 0 °C a není výjimkou, že u mírných zim, zůstává aktivní po celý rok. Proto se často nachází

zvýšený počet sajících klíšťat na jednom hostiteli, což s sebou nese řadu rizik, včetně snazšího přenosu patogenů. V Severní Americe usnadňuje šíření lymeské boreliózy (nejčastěji), babeziózy a lidské granulocytární anaplazmózy (Aliota et al., 2014).

1.5.3. *Ixodes hexagonus*

A



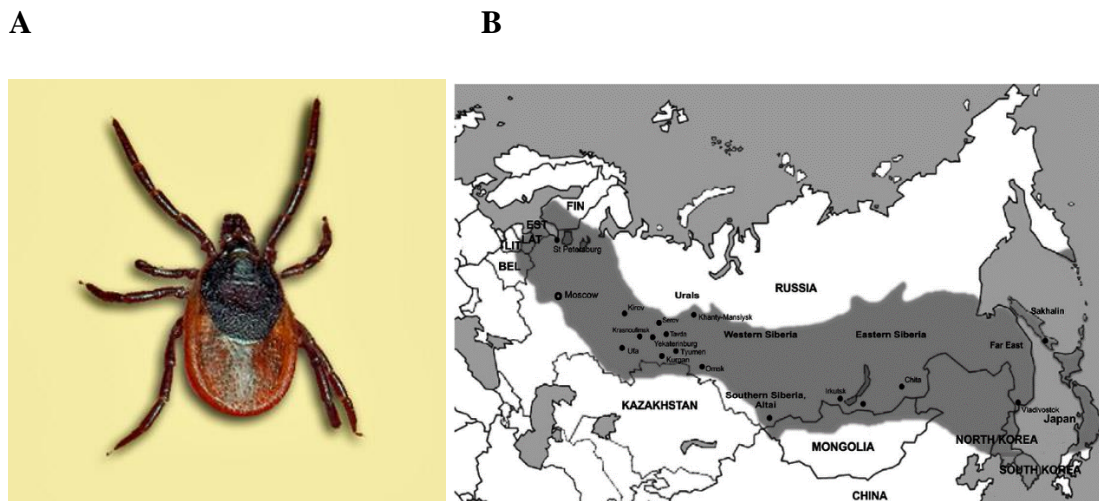
B



Obr. 3: *Ixodes hexagonus* (A) (www.wikipedia.org); výskyt (B) (www.discoverlife.org).

Ixodes hexagonus (obr. 3A) je hojně rozšířen v Evropě a na severozápadě Afriky (obr. 3B), přičemž preferuje městská a příměstská stanoviště. Známým krevsajícím parazitem je ve Velké Británii, kde denzita výskytu vzrůstá od severu k jihu. Hlavním hostitelem je ježek a liška, ve městech psi a kočky. Ojediněle parazituje na hlodavcích, jezevcích, popřípadě člověku. Prodělává opět tříhostitelský cyklus. Nejvyšší aktivity dosahuje na jaře a na podzim a stejně jako *Ixodes ricinus* přenáší spirochety *Borrelia burgdorferi* (Piesman et. Gern, 2004). Obecně je však považován za méně významného vektora, protože se specializuje na úzké spektrum hostitelů. Naproti tomu ve Španělsku je *Ixodes hexagonus* z veterinárního hlediska obávaný druh, který přenáší prvoka *Theileria annae* způsobujícího babeziózu u psů (Camacho et al., 2003).

1.5.4. *Ixodes persulcatus*



Obr. 4: *Ixodes persulcatus* (A) (www.wikipedia.org); výskyt (B) (Esteve-Gassent et al., 2016).

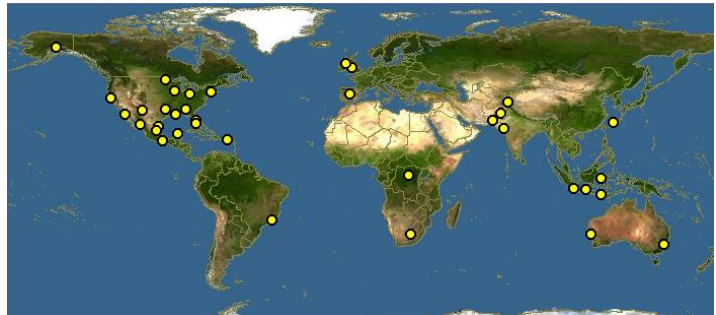
Ixodes persulcatus (obr. 4A) je parazitem domácích i divokých zvířat a člověka. Larvální stádia napadají menší obratlovce, psy, kočky, hlodavce a ježky (Uspensky, 2003). Dospělá samice obvykle saje 6–10 dnů, poté odpadne a naklade 2000–4000 vajíček (Uspensky, 2003). Délka životního cyklu je do jisté míry závislá na klimatických podmínkách, ale ve většině případů trvá 3 roky, než se z larvy stane dospělec (Uspensky, 2003). *Ixodes persulcatus* se vyskytuje v pásu od Baltského moře až po Tichý oceán (obr. 4B), kde žije ve smíšených lesích, a proto bývá označován jako klíště tajgy (Uspensky, 2003). Vyhledává vlhká, mírně stinná stanoviště s vysokou trávou např. paseky, rokle, břehy potoků apod. *Ixodes persulcatus* se v těchto oblastech významně podílí na šíření lymeské boreliózy, východního a sibiřského podtypu klíšťové encefalitidy a babeziózy (byla pozorována i koinfekce) (Uspensky, 2003).

1.5.5. *Rhipicephalus sanguineus*

A



B



Obr. 5: *Rhipicephalus sanguineus* (A) (www.influentialpoints.com); výskyt (B) (www.discoverlife.org).

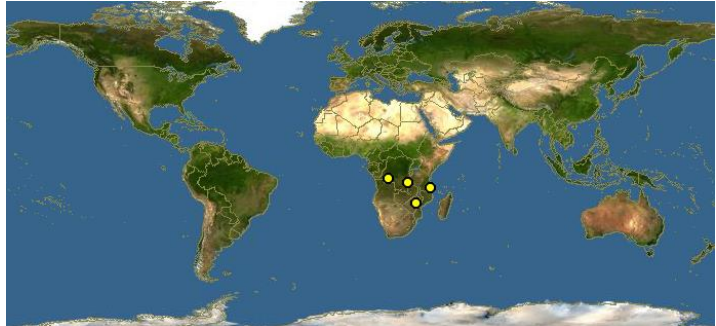
Rhipicephalus sanguineus nebo také „brown dog tick“ (obr. 5A) je celosvětově nejvíce rozšířený druh klíštěte (obr. 5B). Je přizpůsobený k životu v uzavřeném prostoru a relativně konstantním podmínkám, které představují zahrady nebo útulky (Dantas-Torres et al., 2010). Prodělává tříhostitelský cyklus a jeho typickým hostitelem je pes, zřídka jiné domácí zvíře nebo člověk. Ve srovnání s jinými druhy (kromě rodu *Rhipicephalus*) má kratší hypostom, kterým se pevně přichytí k horním vrstvám kůže, především na hlavě, v uších nebo na zádech. V závislosti na stádiu saje různě dlouhou dobu. Dospělá samice přibližně jeden týden, pak je oplodněna a může se odpojit a naklást vajíčka (Dantas-Torres et al., 2010). V teplejších klimatických podmínkách, dokončí až 4 generace za rok, což usnadňuje šíření psí ehrlichiozy, babeziózy, středomořské skvrnité horečky a horečky Skalistých hor (Dantas-Torres et al., 2008).

1.5.6. *Rhipicephalus appendiculatus*

A



B



Obr. 6: *Rhipicephalus appendiculatus* (A) (www.influentialpoints.com); výskyt (B) (www.discoverlife.org).

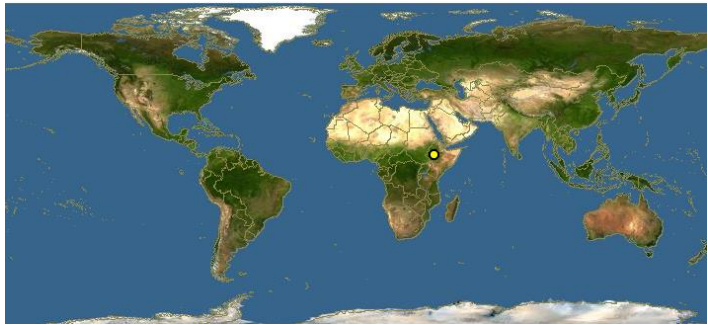
Rhipicephalus appendiculatus („brown ear tick“) (obr. 6A) parazituje na nejrůznějších přežvýkavcích a dalších teplokrevných jihovýchodní Afriky. Jak název napovídá, na svých hostitelích saje v oblasti ušních boltců nebo očních víček a v okolí řitního otvoru (Perry et al., 1991). Prodělává tříhostitelský cyklus, který může absolvovat za vhodných podmínek během 3 měsíců, v jižních oblastech to bývá jeden rok. Všechna stádia mohou sát společně na jednom hostiteli a mnohdy jsou nalézány ve vysokém počtu, až 1000 klíšťat na jednoho hostitele (Perry et al., 1991). Proto zemědělci aplikují na dobytek akaricid jako preventivní prostředek před klíšťaty navzdory tomu, že se metoda časem stává finančně náročnou a mnohdy ne zcela účinnou (Perry et al., 1991). *Rhipicephalus appendiculatus* se vyskytuje pouze v Africe v jižní a východní části kontinentu (obr. 6B). Lze ho snadno zaměnit s *Rhipicephalus zambeziensis*, ale na rozdíl od něj je *R. appendiculatus* vektorem parazitického prvoka *Theileria parva*, který způsobuje horečku východního pobřeží, fatální onemocnění skotu. Dále umožňuje přenos *Anaplasma bovis*, *Rickettsia conori* a dalších patogenů (Perry et al., 1991).

1.5.7. *Rhipicephalus pulchellus*

A



B



Obr. 7: *Rhipicephalus pulchellus* (A) (www.influentialpoints.com); výskyt (B) (www.discoverlife.org).

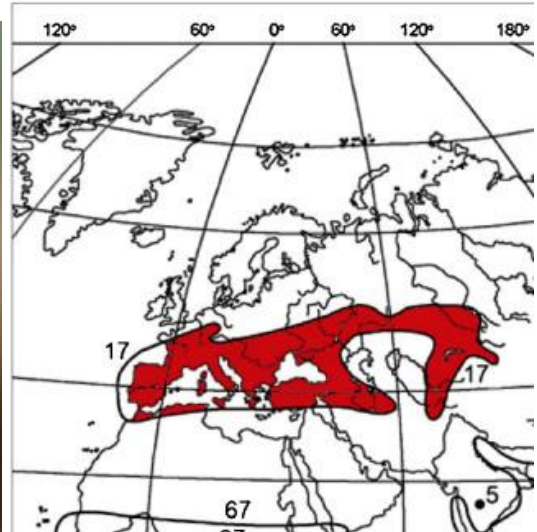
Rhipicephalus pulchellus (obr. 7A) je morfologicky snadno rozpoznatelný podle ornamentů na hřbetním štítku. Žije v savanách, stepích a pouštích severovýchodní Afriky, hlavně v Etiopii a Somálsku (obr. 7B). Prodělává tříhostitelský cyklus a nejvyšší aktivity dosahuje v období dešťů. Saje krev na celé řadě hostitelů, mezi nimiž převládají zebry, antilopy, velbloudi, ovce nebo kozy a náhodně také člověk. Často se přichytí na spodní straně těla – na hrudi, genitáliích a okolo řitního otvoru (Walker, 2001). I přes špatně přístupná místa mohou tyto parazity odstranit ptáci (Klubákovití) a posloužit jim jako potrava (Weeks, 2000). V některých oblastech s vyšším výskytem má vliv na místní hospodářství, konkrétně dojde k velké ztrátě krve u skotu a ke snížení živočišné produkce. Navíc jako vektor přenáší nairobskou nemoc ovcí, klíšťový tyfus a africkou theileriózu, která je patogenní u antilop, ale benigní u dobytka (horečku východního pobřeží však nepřenáší) (Walker, 2001).

1.5.8. *Dermacentor marginatus*

A



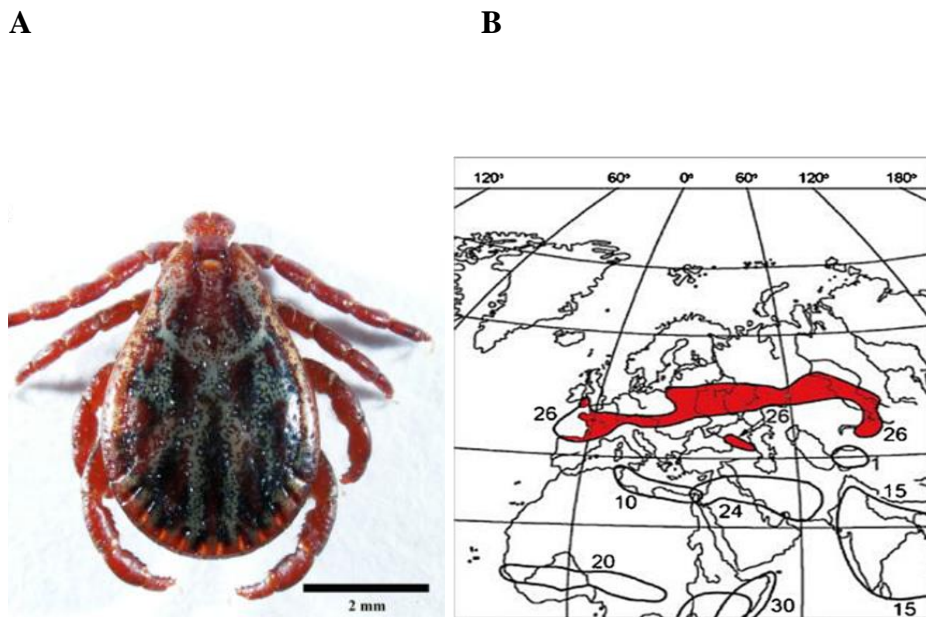
B



Obr. 8: *Dermacentor marginatus* (A) (www.wikipedia.org); výskyt (B) (Rubel et al., 2016).

Dermacentor marginatus, piják stepní (obr. 8A) saje na širokém spektru hostitelů, nižší stádia na menších savcích, dospělci nejčastěji na ovčích a jiných domestikovaných zvířatech, výjimečně i na lidech (Walter et al, 2016). Tříhostitelský vývojový cyklus trvá jeden až dva roky v závislosti na klimatických podmínkách. Je rozšířený ve stepních oblastech od severní Afriky přes střední Evropu až do Íránu, Kazachstánu a střední Asie (obr. 8B) (Walter et al, 2016). Je jedním ze dvou druhů pijáků žijících v Evropě. *Dermacentor marginatus* je spíše teplomilný, ale v důsledku globálního oteplování se šíří také do severních oblastí. Opět přenáší množství patogenů například *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia raoulti*, *Coxiella burnetti*, TBE virus, různé druhy Anaplasmy a další (Walter et al, 2016).

1.5.9. *Dermacentor reticulatus*



Obr. 9: *Dermacentor reticulatus* (Földvári et al., 2016); výskyt (B) (Rubel et al., 2016).

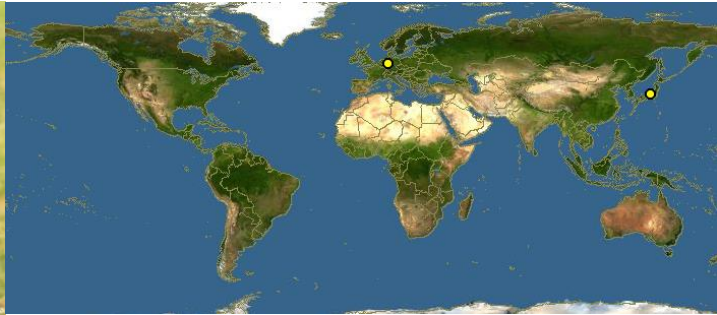
Dermacentor reticulatus, piják lužní (obr. 9A) je druhým z dvojice evropských pijáků. Prodělává tříhostitelský cyklus a parazituje na více než 60 různých druzích domácích nebo divokých zvířat (Földvári et al., 2016). Běžně saje ve skupinkách, což způsobuje viditelné léze v srsti a lokální zánět (Földvári et al., 2016). Délka pití se liší od 7 až po 15 dnů s ohledem na roční období (Földvári et al., 2016). Životní strategie *Dermacentor reticulatus* je téměř ideální. Vyniká v rychlé reprodukci, velkém počtu vajíček ve snůšce – okolo 7200 (Šimo et al., 2004) a adaptabilitě k nepříznivým podmínkám. Dospělci jsou schopni přežít až 4 roky bez příjmu potravy (Földvári et al., 2016) nebo několik měsíců pod vodou. Nejvíce aktivní je na přelomu března a dubna, ale v podstatě se s ním můžeme setkat v průběhu celého roku, protože odolává i teplotám $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Földvári et al., 2016). Vyskytuje se v mírném pásu v úzkém pruhu od severního Portugalska po střední Asii (obr. 9B). Vzhledem k širokému spektru hostitelů je významným vektorem různých patogenů způsobující Omskou hemoragickou horečku, psí babesiózu, klíš'ovou encefalitidu aj. (Földvári et al., 2016).

1.5.10. *Haemaphysalis concinna*

A



B



Obr. 10: *Haemaphysalis concinna* (A) (www.naturabohemica.cz); výskyt (B) (www.discoverlife.org).

Haemaphysalis concinna (obr. 10A) je morfoloicky zaměnitelný s pijáký rodu *Dermacentor*, ale na rozdíl od nich, *Haemaphysalis concinna* nemá vyvinuté oči a je tmavší barvy (Rosický, 1979). Je typickým parazitem hlodavců, kopytníků, ojedinele ptáků, plazů nebo člověka. Nižší vývojová stádia preferují menší hostitele, kdežto dospělci sají na větších obratlovcích (Rosický, 1979). Nejvyšší aktivity dosahuje na přelomu dubna-května a v srpnu (Rosický, 1979). Areál výskytu je poměrně široký, zahrnuje Čínu, Rusko, Francii, Německo a Polsko (obr. 10B) (Teng and Jiang, 1991). Upřednostňuje vlhká místa jako louky, břehy toků a lužní lesy. Co se týče patogenů, byl zaznamenán přenos *Francisella tularensis*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia heilongjiangensis*, viru ruské jaro-letní encefalitidy a klíšťové encefalitidy.

1.5.11. *Amblyomma americanum*

A



B



Obr. 11: *Amblyomma americanum* (A) (www.wikipedia.org); výskyt (B) (www.wikipedia.org).

Klíště *Amblyomma americanum* (obr. 11A) lze snadno rozpoznat podle světlé skvrny na přední části scuta a jemného tečkování na zbytku hřbetu. Každé stádium vyžaduje krmení na jiném hostiteli tzn. že prodělává tříhostitelský cyklus. Napadá především jelence běloocasé, divoké krocany a další obratlovce, včetně člověka. Považuje se za vysoce životaschopný a agresivní druh. Samice saje 7 dní, poté odpadne a naklade okolo 5000 vajíček v jediné snůšce. Životní cyklus za vhodných podmínek trvá jen 2 roky. Navíc se v poslední době objevují záznamy o spojitosti mezi kousnutím tohoto klíštěte a alergií na červené maso. Pacienti mají specifické IgE protilátky proti oligosacharidovému epitopu – galaktózo- α -1,3-galaktóze, který je na povrchu buněk hovězího, vepřového a jehněčího masa (Commins et al., 2009). Klíště *Amblyomma americanum* se rozšířilo na východním pobřeží USA (obr. 11B). Upřednostňuje místa hustého lesního porostu nebo vysoké trávy, kde aktivně vyčkává na vrcholu porostu (Anderson et al., 1993). Díky snadnému transportu na hostitelích se jeho populace rozšiřuje směrem na sever i na jih a způsobuje problémy v různých odvětvích. Je obávaným parazitem domácích zvířat včetně psů a koček, může se podílet na úhynu jelence běloocasého, přenáší několik závažných onemocnění a pravděpodobně po kousnutí vzniká anafylaxe na červené maso. K závažným chorobám patří ehrlichioza, STARI (pravděpodobně přenáší

Borrelia onestari), Q horečka a tularémie. Naopak přenos lymeské boreliózy zatím nebyl prokázán (Ledin et al., 2005).

1.6. Tumor necrosis factor alfa

Gen pro tumor necrosis factor alfa (TNF- α) leží na chromozomu 6p21.3, má velikost asi 3 kb a obsahuje 4 exony, přičemž poslední z nich kóduje více než 80 % produkovaného proteinu (Nedwin et al., 1985). Je členem velké rodiny TNF, kam patří dalších 18 ligandů a 29 receptorů (Heider et al., 2009) např. TNF- β , lymfotoxin α a β , Fas ligandy a jejich receptory atd. Poprvé byl izolován v roce 1975 Carswellem a kolektivem, ve snaze určit cytotoxický faktor zodpovědný za nekrózu (Heider et al., 2009). V organismu plní mnoho úloh, které souvisí s regulací imunitní odpovědi, indukcí zánětu, buněčnou smrtí, kachexií, horečkou (endogenní pyrogen), inhibicí tumorogeneze a virové replikace. Množství pleiotropních účinků patrně souvisí s početnými buněčnými populacemi, které tento cytokin produkují. Jsou to například makrofágy, T lymfocyty, mastocyty, granulocyty, NK buňky, fibroblasty, neurony, keratinocyty a buňky hladké svaloviny (Tracey et al., 2008). Tyto buňky netvoří TNF- α samovolně, ale potřebují stimul v podobě bakteriálního lipopolysacharidu nebo interleukinu IL-1, IFN- γ anebo GM-CSF (Koník et al., 2006).

Pro úplnost bych ještě zmínila, že TNF- α se také účastní metabolismu lipidových kyselin (Chen et al., 2009), koagulace a fibrinolýzy (Levi et al., 2006). Je proto nepostradatelný při udržení homeostázy organismu. Lokální zvýšení koncentrace TNF- α má podobu zánětu s typickým otokem, zvýšenou teplotou, zarudnutím a bolestí. Naopak systémové zvýšení iniciované LPS apod. vede k rozvoji septického šoku (Männel et al., 1999). Nízká koncentrace TNF- α z dlouhodobého hlediska vede k celkovému neprospívání a kachexii, jak tomu bývá u pacientů s nádorovým onemocněním (Beutler et al., 1985). (Pro tuto vlastnost se mu dříve říkalo kachexin).

Pakliže by došlo ke snížení jeho sekrece nebo aktivity, důsledkem by byla nedostatečnost imunitní odpovědi a vůbec celkové selhání obranných mechanismů proti některým patogenům (Kaplan et al., 1996). V opačném případě, kdyby se tvořilo více TNF- α oproti normálnímu stavu, organismus by zareagoval přehnaně, což by vedlo k autoimunitnímu onemocnění (Heel et al., 2002). To je jeden z hlavních důvodů, proč se inhibitor TNF- α používá k biologické

lčbě autoimunit jako je revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění střev, ankylozující spondylitida, psoriáza a další (Constantin et al., 2004).

TNF- α je primárně produkovaný v podobě transmembránového proteinu (tmTNF- α) typu II o velikosti 26 kDa (Horiuchi et al., 2010). Stabilitu molekuly zajišťuje homotrimerní struktura a zvonovitý tvar molekuly, který je znakem pro TNF rodinu, ale zároveň pro některé povrchové části obalených virů, zejména satellite tobacco necrosis virus (Eck and Sprang, 1989). Integrovaná membránová molekula umožňuje buňkám přímou komunikaci bez dalších přenašečů informace (Heider et al., 2009). TmTNF- α se může v některých případech chovat jako ligand a jindy jako receptor. To je zásadní rozdíl oproti druhé, solubní formě, která zprostředkovává přenos signálu do vzdálených míst od sekretující buňky (Horiuchi et al., 2010). Jiným důležitým aspektem tmTNF- α je posttranslační modifikace (fosforylace) serinových zbytků v intracelulární doméně, která patrně slouží k regulaci funkce (Horiuchi et al., 2010).

Solubní forma (sTNF- α) vzniká z transmembránové enzymatickým štěpením a má velikost 17 kDa (Horiuchi et al., 2010). K přeměně dojde oddělením extracelulární části tmTNF- α za pomoci metaloproteázy TNF- α converting enzyme (TACE; ADAM17) (Tang et al., 1996). Po odštěpení nově vzniklého sTNF- α se zbytek transmembránové formy přenesou do jádra buňky produkující tmTNF- α (Domonkos et al., 2001). Trimerní sTNF- α není zdaleka tak stabilní jako tmTNF- α , a proto má v organismu tendenci k disociaci na protomery, které jsou v koncentracích menších než nanomolárních, tím sTNF- α ztrácí svou biologickou aktivitu (Wajant et al., 2003). Strukturu protomerů tvoří antiparalelní β -skládané listy z antiparalelních β -řetězců uspořádané do tzv. „jelly roll“ (Wajant et al., 2003).

1.7. Receptory TNFR1 a TNFR2

Biologická aktivita TNF ligandů je zprostředkována vazbou na specifické receptory.

Jak tmTNF- α , tak sTNF- α jsou ve formě trimeru vázány z části homologními povrchovými receptory TNFR1 (TNF receptor type 1; CD120a; p55/60) a TNFR2 (TNF receptor type 2; CD120b; p75/80) (Theiss et al., 2005). Podobně jako ligandy, jejich receptory vytváří strukturu trimeru. První typ, TNFR1, je exprimovaný na většině buněk s různou hustotou a váže obě formy TNF- α . Na rozdíl od TNFR1, druhý receptor TNFR2 je přítomen pouze

v cytoplazmatické membráně buněk imunitního systému (především na T lymfocytech) a reaguje jen s membránovou formou. Přesné příčiny rozdílných vazeb receptorů nebyly zatím popsány (Haider et al., 2009).

Společným znakem receptorů je přítomnost intracelulárních a extracelulárních domén, které svou strukturou zajišťují specifickou vazbu ligandu a přímý přenos signálu buňce.

Ve své extracelulární doméně obsahují 4 konzervativní místa bohatá na cystein, která jsou klíčová v interakci s ligandem (Wajant et al., 2003). Bylo prokázáno, že distální oblast, která se nazývá PLAD (pre-ligand binding assembly domain), udržuje TNFR1 a TNFR2 v konformaci, která zabraňuje spontánní autoaktivaci, usnadňuje vazbu ligandu a v neposlední řadě vznik trimerizovaného receptoru (Chan et al., 2000).

Úlohu receptorů v organismu definuje několik *in vivo* pokusů. Flynn et al. (1995) infikovali myši bez TNFR1 bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis*. Prokázali, že TNFR1 je nezbytný v ochraně nejen před infekcí, ale také před reaktivními formami dusíku z makrofágů a následky nekrózy.

Kim et al. (2006) se zaměřili na receptor TNFR2. Obdobně jako v předešlé práci infikovali TNFR2-deficitní myši. Z experimentů vyvodili, že přežití během klonální expanze pomocných i cytotoxických T lymfocytů silně závisí na TNFR2. Kaskáda navazujících dějů u kontrolních jedinců vedla až k lokální akumulaci efektorových buněk a likvidaci intracelulárního patogena. Pokusná zvířata s deficitem TNFR2 proto trpěla na oddálenou likvidaci patogena.

Po shrnutí poznatků může být TNFR1 označen jako primárně odpovědný za zahájení zánětlivé odpovědi, kdežto komplexní kontrolu imunitního systému lze přisuzovat receptoru TNFR2 (Naudé et al., 2011).

1.7.1. TNFR1 signalizace

Spojení ligandu TNF- α s receptorem TNFR1 je klíčovým stavem pro aktivaci signálních drah, které v buňce vyvolávají dva různé stavy, apoptózu nebo aktivaci transkripčních faktorů a následnou proliferaci. Důsledkem je celková regulace zánětlivé odpovědi.

V intracelulární části můžeme u TNFR1 nalézt death doménu (u TNFR2 nikoliv), která je za běžných podmínek inhibována proteinem SODD a k přenosu informace nedochází (Jiang et al., 1999). Jiná situace nastane po vazbě TNF- α na TNFR1. Molekula SODD disociuje a místo ní se naváže protein TRADD, tak dojde ke spuštění jedné ze tří signálních drah (Hsu et al., 1995).

TRADD má funkci adaptorové molekuly a umožňuje přenos signálu buď směrem k apoptóze, nebo k proliferaci. Pokud je cílem proliferace buňky, TRADD vytváří signály pro vznik komplexu I. Ten je složený z receptoru TNFR1, proteinů TRADD, RIP a TRAF2. Komplex I umožní aktivaci transkripčního faktoru NF κ B (nuclear factor κ B) prostřednictvím fosforylace MAP kináz. Efekt aktivovaného transkripčního faktoru NF κ B působí na proliferaci a regulaci zánětu, onkogenezi nebo buněčný stres (Heider et al., 2009). Je schopný proniknout do jádra buňky a spustit přepis anti-apoptotických genů cIAP-1, cIAP-2, cFLIP, TRAF1, a TRAF2 (Naudé et al., 2011).

Alternativní dráha, která je naopak pro buňku fatální, se odlišuje ve fázi vytvoření komplexu. Opět protein TRADD iniciuje seskupení několika molekul, ale v tomto případě se TRADD – RIP – TRAF2 jako celek uvolní od receptoru TNFR1. Následuje připojení proteinu FADD a prokaspázy-8 na TRADD a vzniká komplex II. Komplex II aktivuje řadu dalších intracelulárních kaspáz až na konec dojde k apoptóze (Wang et al., 2008).

Třetí možná signalizace zahrnuje stejné navázané proteiny TRADD-RIP-TRAF2, a navíc ještě kinázu ASK1. Pozdější děje zahrnují z velké části fosforylace různých molekul včetně MAP kináz a v terminální části fosforylaci JNK a p38. Podobně jako předešlá dráha, i tato končí buněčnou smrtí (Haider et al., 2009).

1.7.2. TNFR2 signalizace

Receptor TNFR2 preferenčně váže tmTNF- α a do jisté míry má opačný efekt než vazba s TNFR1 (Horiushi et al., 2010). Ve srovnání s dráhou zahrnující TNFR1, je signalizace přes receptor TNFR2 jen málo prozkoumána, ale patrně se podílí na patogenezi zánětlivých onemocnění. U pacientů s revmatoidní artritidou (Constantin et al., 2004) nebo systémovým lupusem (Morita et al., 2001) byl pozorován polymorfismus M196R v receptoru TNFR2, který je pravděpodobně asociován se systémovým zánětlivým onemocněním.

Signální molekuly přes TNFR2 jsou do jisté míry stejné jako u TNFR1, ale v konečném efektu na buňku se liší. V intracelulární části nezahrnuje žádnou doménu smrti, přesto TNFR2 může přímo interagovat s TRAF proteiny a využít stejných přenašečů signálu jako TNFR1 (Haider et al., 2009). Za pomoci TRAF2 proteinu se aktivuje řada MAP kináz a nakonec JNK. V návaznosti na další kinázy přes komplex TRAF3 se aktivuje NF κ B, což vede ke stimulaci transkripčních faktorů a proliferaci (Cho et al., 2003). Zásadní rozdíl v aktivaci NF κ B oproti stimulaci TNFR1, je časová prodleva. TNFR1 dokáže aktivovat NF κ B v rámci minut, kdežto u TNFR2 jsou to hodiny (Naudé et al., 2011).

Jiné podněty mohou v buňce způsobit apoptózu i přesto, že TNFR2 neobsahuje death doménu. Tuto skutečnost vysvětluje model vzájemné interakce a provázanosti signálů TNFR1 a TNFR2 (u buněk, kde jsou přítomné oba receptory) (Naudé et al., 2011). Klíčovou molekulou v komunikaci mezi receptory je TRAF1. Ta je syntetizován po aktivaci NF κ B dráhou přes TNFR1. Vzniklá molekula TRAF1 je začleněná v signálních drahách obou receptorů a regulací jejího množství v buňce se receptory vzájemně ovlivňují. Pakliže setrvává signál aktivace NF κ B, syntetizuje se více TRAF1 a buňka je chráněná před apoptózou (Naudé et al., 2011). Opačná regulace vede k buněčné smrti.

Mimo výše popsané efekty TNFR2 byl pozorován také vliv na modulaci buněčné adheze, migraci, reparaci poškozených buněk, přežití buněk a angiogenezi (Zhang et al., 2003). TNFR2 je zapojený také v reverzní signalizaci, kdy po spojení tmTNF- α a TNFR2 se potlačí jednak exprese cytokinů a jednak se utlumí apoptóza buněk prezentujících tmTNF- α .

TNFR2 je proto důležitým regulátorem funkce T lymfocytů (Eissner et al., 2004).

1.8. Inhibice TNF- α

Nedílnou součástí strategických mechanismů klíštěte, je obrana proti působení cytokinů. Ty jsou pro imunitní systém hostitele nepostradatelným prostředníkem v regulaci odpovědi, a proto ve vývoji parazitů došlo k vytvoření řady molekul zaměřených proti prozánětlivým cytokinům. Anti-cytokinovou aktivitu zprostředkovanou přímou vazbou molekuly a cytokinu popisují některé práce jako například „Identification of an IL-2 binding protein

in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*“ (Gillespie et al., 2001) nebo „Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts“ (Hajnická et al., 2001). Druhá uvedená práce se týkala skupiny klíšťat (*Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Haemaphysalis inermis* a *Ixodes ricinus*), u kterých byl ve slinách nalezen vazebný protein pro IL-8 (Hajnická et al., 2001). Nepřímá inhibice cytokinů byla objevena v SGE z klíštěte *Dermacentor andersoni*, kde SGE zabránil produkci IL-1, TNF- α , IL-2 a IFN- γ (Ramachandra et al., 1992).

Pokud se jedná o anti – TNF aktivitu, lze říci, že byla dlouho dobu popisována jako inhibice produkce aktivního cytokinu (Gwakisa et al., 2001). Jako příklad lze uvést protein IRIS (43kDa) izolovaní z klíštěte *Ixodes ricinus*, který měl mnoho imunosupresivních vlastností včetně potlačení produkce IL-6, IL-8 a TNF- α (Prevot et al., 2009). Jiným proteinem s podobným charakterem je Sialostatin L (12,5kDa) z klíštěte *Ixodes scapularis*, který v menší míře také potlačuje sekreci TNF- α a pravděpodobně usnadňuje přenos spirochét *Borrelia burgdorferi* do hostitele (Kotsyfakis et al., 2010). První experiment prokazující přímý účinek slin/SGE z klíštěte *Ixodes ricinus* na TNF- α popisuje až Koník et al. (2006).

Pokud bychom hledali u jiných organismů podobný mechanismus imunosuprese, který by se zaměřoval na sekretovaný TNF- α , tak je popsán jen u několika málo druhů (uvedených níže), kteří si dokonce nejsou ani blízce příbuzní.

1.8.1. Vazebný protein

Nejprimitivnější zástupci, u kterých byly nalezeny antagonisté TNF- α jsou poxviry. Tyto vazebné proteiny napodobují domény TNF- α receptorů u hostitelů, a tak snadno váží i malé koncentrace cytokinu (Rahman and McFadden, 2006).

Existují tři skupiny poxvirů, které exprimují TNF- α vazající faktory – Leporipoxviry (s T2 proteiny), Orthopoxviry (s CRM proteiny) a Yatapoxviry (s TNF-BP proteiny) (Masmudar et al., 2009). Inhibici zprostředkovávají různými mechanismy např. napodobují cysteinovou strukturu savčího receptoru, imitují PLAD doménu (virus Myxoma, protein M-T2) nebo dokonce mají podobnou sekvenci s MHC antigeny (Yatapoxviry) (Masmudar et al., 2009).

K hlavním popisovaným poxvirům s anti TNF- α vazebným proteinem patří virus Varioly kódující protein VARV-CrmB (Gileva et al., 2009). Stejně jako ostatní CRM proteiny od Orthopoxvirů, na svém povrchu nese dvě proteinové domény s odlišnou funkcí

(Tsyrendorzhiev et al., 2014). První, N terminální doména, je zodpovědná za vazbu TNF- α . Druhá, C terminální doména, umožňuje vazbu jiných chemokinů (Alejo et al., 2006). Zajímavou skupinou jsou Tanapoxviry řazené k Yatapoxvirům. U Tanapoxviru byl identifikovaný protein TPV-2L, vázající s vysokou afinitou TNF- α , ale s ostatními cytokiny z rodiny TNF neinteragoval (Masmudar et al., 2009). Při podrobném výzkumu se ukázalo, že sekvence TPV-2L je z velké části homologní k sekvenci těžkého řetězce MHC-I (Masmudar et al., 2009).

1.8.2. Enzymatické štěpení

Poměrně nedávno byl izolovaný enzym z hadího jedu *Bothrops moojjeni* (BmooMP-alpha-I) inhibující TNF- α (Silva et al., 2016). Jednalo se o zinkovou metaloproteázu štěpící TNF- α (Silva et al., 2016). Tento experiment představoval jedno z vodítek, které mělo přispět k odhalení neznámého proteinu v našem projektu. Inspirací byla především metodika identifikace za použití EDTA jako inhibitoru metaloproteáz.

Kromě hadího jedu, byla nalezena metaloproteáza štěpící TNF- α u bakterie *Legionella pneumophila* způsobující nosokomiální infekce a pneumonii (Hell et al., 1993). V tomto pokuse byl přímý průkaz štěpení cytokinu provedený metodami SDS-PAGE, ELISA a TNF - α bioassay (Hell et al., 1993).

U některých klíšťat byly objeveny také metaloproteázy, které plní různé funkce včetně protizánětlivé aktivity. Jako první byly tyto enzymy izolovány z klíštěte *I. scapularis*, kde byly přítomny ve třech izoformách (Francischetti et al., 2003). Metaloproteázy vykazují kromě gelatinázové aktivity také antifibrinogenní účinek a tím se nápadně podobají hemoragickým proteázám přítomným v hadích jedech (Francischetti et al., 2003). Předpokládá se, že tyto proteázy modulují imunitní odpověď hostitele tak, že dochází ke snadnějšímu přenosu *B. burgdorferi*. Spirochety navíc zpětně stimulují produkci těchto metaloproteáz (Francischetti et al., 2003).

Jiné metaloproteázy, které plní podobnou úlohu, byly objeveny u *H. longicornis* a *I. ricinus*, (Decrem et al., 2008).

2. Cíle práce

- Ověření TNF vázající aktivity v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus*.
- Hledání obdobné aktivity u jiných druhů klíšťat (*Amblyomma*, *Rhipicephalus*).
- Dynamika výskytu TNF inhibiční aktivity během sání klíštěte.
- Pokus o bližší charakterizaci TNF inhibičního faktoru.

3. Materiál a metody

Klíšťata

Pro pokus byly použity nasáté samice výše popsaných druhů klíšťat (*Amblyomma americanum*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus pulchellus*, *Rhipicephalus sanguineus*) z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Vhodným materiálem pro další pokusy byly sliny nebo extrakty ze slinných žláz (SGE). Ačkoliv byl preferovaný odběr slin, u některých druhů klíšťat nebylo možné z praktického hlediska je získat, proto jsme jako alternativu zvolili SGE.

Sběr slin

Samice různých druhů klíšťat (viz výše) sála na hřbetě morčat několik dní do polonasátého stavu. Klíšťata byla poté omyta v 15 % ethanolu a připevněna pomocí oboustranné lepicí pásky na podložní sklo. Na hypostom a jednu palpu jim byla nasazena skleněná mikrokapilára (Sigma) a na hřbet rovnoměrně nanoseny 2 μ l roztoku pilocarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) o koncentraci 50 mg/ml v 96 % ethanolu. Následně probíhala inkubace ve vlhké komůrce v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 2 hodin. Mikrokapiláry byly vyprázdněny a koncentrace proteinu ve slinách byla změřena metodou podle Bradforda (Bradford, 1976). Vzorky byly uchovávány při -75°C.

Příprava SGE

Samice různých druhů klíšťat, u kterých nebyl možný odběr slin, byly omyty v 15 % ethanolu a připevněny pomocí oboustranné lepicí pásky na podložní sklo. Dále jim byla skalpelem odstraněna hřbetní část a pomocí injekční stříkačky nanesena kapka PBS pro zvětšení vnitřních struktur. V hlavové části byly pinzetou odejmuty slinné žlázy a přidány do 500 μ l PBS. Tyto struktury byly homogenizovány pomocí sonikátoru Ultrasonic Processor UP200S (Hielscher) 1 minutu při 60 % amplitudě. Koncentrace proteinu byla změřena metodou podle Bradforda (Bradford, 1976), a poté byl vzorek uchováván při -75°C.

Stanovení koncentrace podle Bradforda

Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která umožňuje změřit koncentraci proteinu ve vzorku. Hledaná hodnota byla odečtena podle kalibrační řady albuminu o koncentraci 50 – 1000 µg/ml. Do mikrotitrační destičky bylo aplikováno 5 µl albuminu z kalibrační řady nebo stejné množství vzorku proteinu (slin nebo SGE), následně bylo přidáno 100 µl Bradfordova činidla. Výsledná absorbance byla změřena spektrofotometrem (Synergy H1 microplate reader, BioTek) při vlnové délce 595 nm. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka a odečtena hodnota koncentrace vzorku proteinu (slin nebo SGE).

3.2. Příprava vzorků

Inkubace slin/SGE z různých druhů klíšťat s TNF- α

Sliny nebo SGE ředěné v PBS ve výsledných koncentracích 0, 5, 10 a 20 µg/ml byly preinkubovány s 2 ng/ml TNF- α (Recombinant Mouse Tumor Necrosis Factor- α (rmTNF- α), Gibco®) ředěném v 10 % PTS 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky použity do cytokinového ELISA testu.

Kinetika inhibice TNF- α v čase

Sledováním množství TNF- α v čase bylo využito k určení, zda má neznámý faktor povahu enzymu nebo vazebného proteinu. SGE z *Ixodes ricinus* ředěný v PBS o výsledné koncentraci 10 µg/ml byl inkubován společně s 2 ng/ml TNF- α v 10 % PTS (Recombinant Mouse TNF – α , Gibco®) při teplotě 37 °C. Supernatant byl odebírán v časových intervalech 0, 5, 10, 20 a 40 minut a uchováván na ledu. V kontrolách v čase 0 a 40 minut byl SGE nahrazen PBS. TNF- α byl detekovaný pomocí ELISA Kitu Ready-Set-GO! (eBioscience).

Inkubace s inhibitory proteáz

Enzymatická aktivita neznámého inhibičního faktoru ze slin/SGE byla zkoumána za použití směsi inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) a inhibitoru metaloproteáz

(EDTA 0.5M, Sigma). SGE z *Ixodes ricinus* ředěný v PBS o výsledné koncentraci 10 µg/ml byl inkubován společně s 2 ng/ml TNF-α (Recombinant Mouse TNF-α, Gibco®) v 10 % PTS a koktejlem inhibitorů (Protease inhibitor cocktail, Sigma) zředěným podle návodu výrobce 1:100. V druhém případě byla místo směsi inhibitorů přidána EDTA buď v koncentraci 10 µM, anebo 10 mM ředěná v PBS. Takto připravené vzorky byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě. V pozitivní kontrole byly vzorky bez jakýchkoliv inhibitorů, v negativní kontrole byl SGE nahrazen PBS. TNF-α byl detekovaný pomocí ELISA Kitu Ready-Set-GO! (eBioscience).

3.3. Cytokinová ELISA

Anti – TNF aktivita ve vzorcích byla detekována pomocí sandwichového ELISA testu za použití komerčního ELISA Kitu Ready-Set-GO! (eBioscience).

Na dno 96 jamkové mikrotitrační destičky (Costar) bylo navázáno 50 µl vazebné protilátky proti TNF-α (Capture Antibody Anti Mouse TNF-α, eBioscience) ředěné 250x v coating puftru (Coating Buffer Powder, eBioscience). Destička byla inkubována přes noc ve vlhké komůrce při 4°C. Následující den byla destička 3x promyta roztokem PBS+Tween (0,05%), inkubována s 200 µl 1x Assay diluent (eBioscience) 1 hodinu při pokojové teplotě pro vyblokování nescifických vazeb. Následovalo opět promytí – 5x roztokem PBS+Tween (0,05%). Do vysušených jamek byly nanášeny předem připravené vzorky (viz výše) a standard ředěný dvojkovou řadou v PBS (počáteční koncentrace kalibrační křivky byla 4 ng/ml TNF – α). Destička byla inkubována přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce. Třetí den byly jamky 4x promyty roztokem PBS+Tween (0,05%), do jamek bylo přidáno 50 µl biotinylované detekční protilátky (Detection Antibody, eBioscience) ředěné 250x v 1x Assay diluent (eBioscience). Inkubace probíhala 1 hod ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Dále byly jamky 6x promyty PBS+Tween (0,05%) a inkubovány s 50 µl Avidin-HRP (Detection enzyme, eBioscience) ředěným 250x v 1x Assay diluent (eBioscience) po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Na závěr byl panel 7x promyt a do jamek bylo přidáno 100 µl 1x TMB ELISA substrate solution (eBioscience). Reakce probíhala ve tmě přibližně 10 min,

než se vyvinul barevný signál, poté se zastavila přidáním 100 μ l 2M H₂SO₄. Absorbance byla měřena při 450nm na spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader, BioTek).

3.4. WESTERN BLOTTING

Za účelem identifikace neznámého inhibičního proteinu byla použita metoda western blottingu. V pokusu byly sliny z *Ixodes ricinus* v koncentraci 10, 5 a 2,5 μ g/ml preinkubované 1 hodinu s 2ng/ml TNF- α v loading pufru (4x Loading Dye Laemelli buffer, BIORAD). V kontrolách byly buď samotné sliny v koncentraci 10 μ g/ml, anebo 2ng/ml TNF- α . Na 10 % SDS PAGE byly nanесeny vzorky po 20 μ l a proteiny byly rozděleny podle velikosti. Elektroforéza probíhala pod napětím 250 V 40 minut v ELFO pufru (26 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,5 M SDS). Gel s rozdělenými proteiny se promyl v transferovém pufru (26 mM TRIS, 192 mM glycin, 2 mM SDS, 20 % methanol).

Dále bylo nutné aktivovat membránu (PVDF, Thermo Scientific) omytím v metanolu a v transferovém pufru. Proteiny byly přeneseny na membránku v přístroji Semi-Dry Blotter (Scie-Plas). Zdroj byl nastaven na 300 mA a napětí 140 V, přenos trval 1,5 hodiny. Přeblované membrána byla promyta roztokem TBS s 0,1 % Tweenem (19 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20). Následně se nechala vysycovat v 5 % sušeném odtučněném mléce v TBS s 0,1 % Tweenem (19 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20) po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě na třepačce (Unimax 2010, Heidolph). Membránka byla dále inkubována s primární protilátkou proti TNF- α (TNF- α Rabbit mAb, Cell Signaling Technology) naředěnou 1:1000 v 8 ml mléka přes noc při 4 °C na rotátoru (3D, Sunflower Mini-Shaker, Biosan). Druhý den byla membránka celkem pětkrát promyta v TBS s 0,1 % Tweenem – 2x rychle, po 15 minutách, po 20 a 25 minutách při laboratorní teplotě na třepačce. Poté byla inkubována se sekundární protilátkou (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology) ředěnou 1:1000 v 8 ml mléka 45 minut při laboratorní teplotě na třepačce. Na závěr se ještě promyla roztokem TBS s 0,1 % Tweenem – 3x po 5 minutách. Těsně před vizualizací v přístroji Alliance 4.7, Gel Documentation Systems (UVITEC Cambridge) se smíchaly substrátové roztoky Detection reagent 1 a 2 (Thermo Scientific) v poměru 1:1 a nanесly se na membránku.

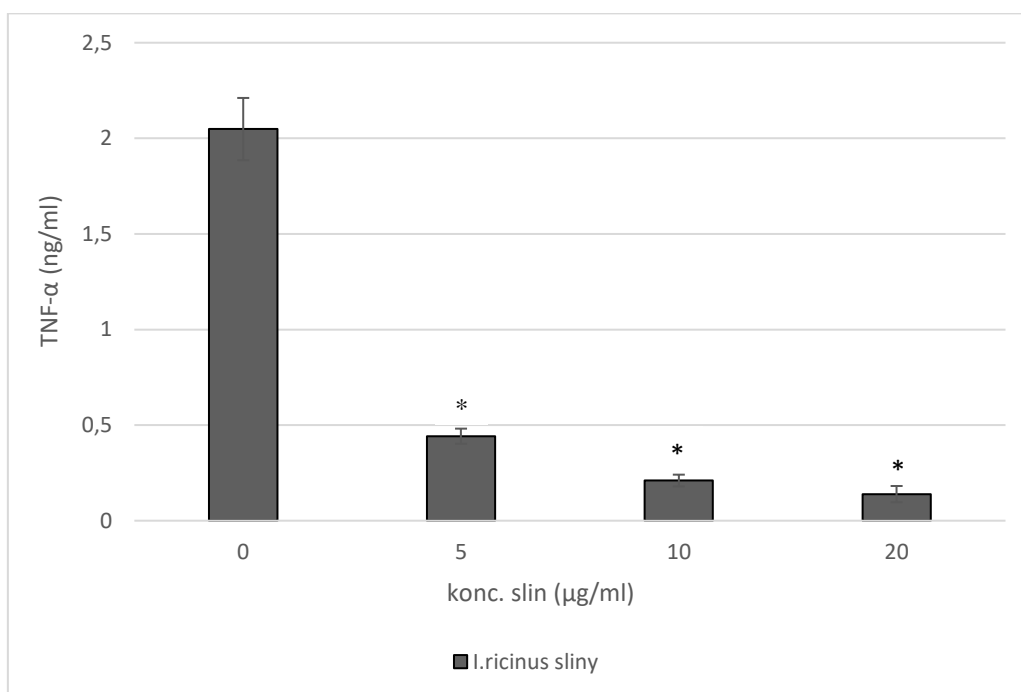
3.5. Statistické zpracování dat

V každém experimentu byly vzorky aplikovány v triplikacích. Z naměřených hodnot byly v programu Microsoft Excel vypočteny průměry a směrodatné odchylky a poté použity do grafů. Statistická analýza byla provedena podle Studentova t-testu (nepárového). Statisticky významné odchylky mezi skupinami byly v grafech označeny hvězdičkou (* $p < 0,05$).

4. Výsledky

Ověření TNF- α vázající aktivity v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus*

Pro ověření TNF- α inhibiční aktivity u *Ixodes ricinus* byly sliny inkubovány v různých koncentracích (20, 10 a 5 μg proteinu/ml) s rekombinantním TNF- α (2 ng/ml). V kontrole byl inkubován samotný TNF- α (2 ng/ml) v PBS. Posléze byly vzorky převedeny do cytokinového ELISA testu s protilátkami proti danému cytokinu. Sledoval se úbytek cytokinu v jednotlivých vzorcích (obr. 12).



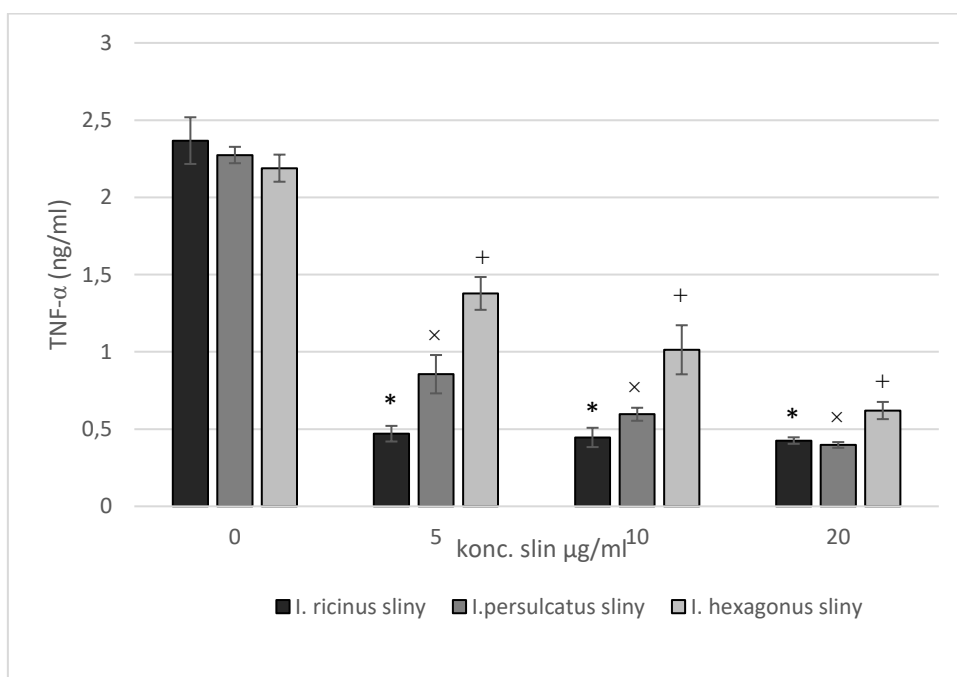
Obr. 12: Anti – TNF- α aktivita v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Koncentrace TNF byla změřena metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF – α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Čím vyšší koncentrace slin byla použita, tím nižší koncentrace TNF- α se detekovala. Nejvyšší koncentrace slin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) z *Ixodes ricinus* inhibovala 93 % TNF- α oproti kontrole s 2 ng/ml. U koncentrace 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to bylo 90 % a 78 % u 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ slin.

TNF-inhibiční aktivita u jiných druhů klíšťat

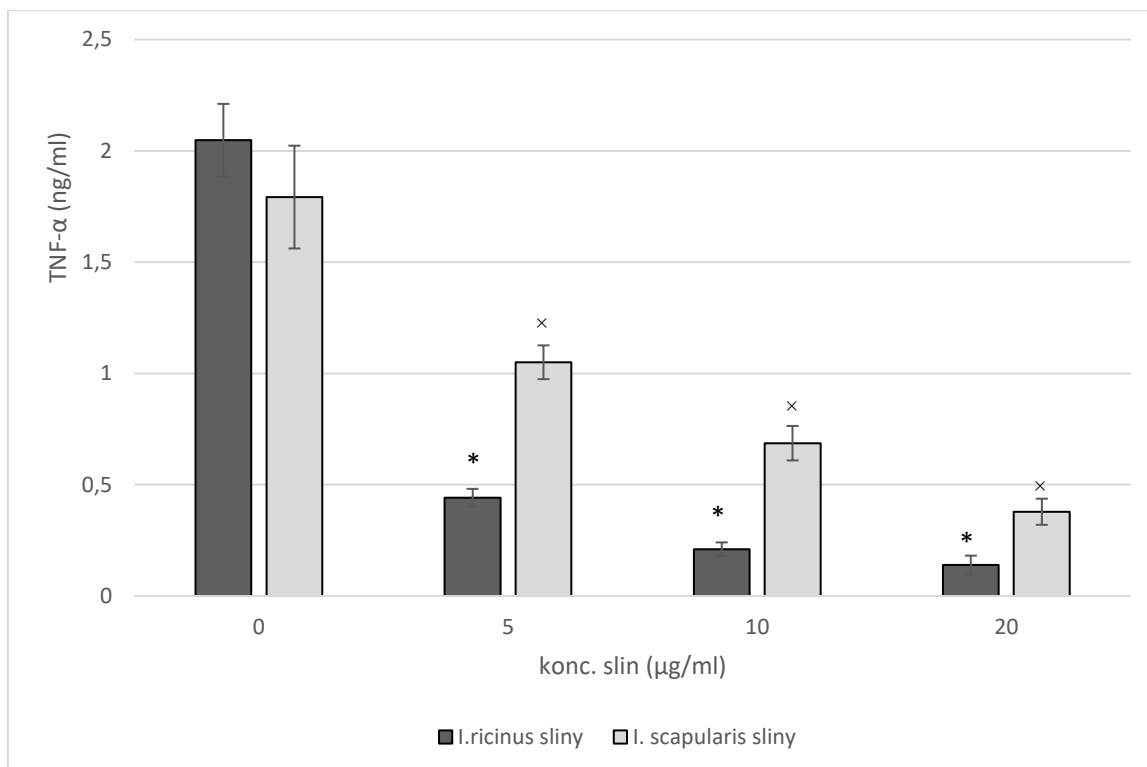
Výsledek předchozího experimentu potvrdil již dříve zkoumaný inhibiční efekt u *Ixodes ricinus* (Koník et al., 2006) a proto byla hledána obdobná aktivita u jiných druhů klíšťat (viz níže). Pro věrohodnost výsledků byl v každém pokusu porovnáván účinek slin/SGE z *Ixodes ricinus* se slinami/SGE z různých druhů klíšťat ve stejných koncentracích (20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$).

Mezi prvními studovanými klíšťaty byl rod *Ixodes*, konkrétně *Ixodes persulcatus* a *Ixodes hexagonus* (v pozdějším experimentu byl zahrnut *Ixodes scapularis*). Jak je vidět z grafu (obr. 13), oba tyto druhy vykazovaly inhibiční efekt na TNF- α . V koncentraci 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ byla suprese silnější u *I. ricinus*, v koncentraci 20 μg byl účinek *I. ricinus* a *I. persulcatus* téměř shodný, *I. hexagonus* slabě přesáhl hodnotu 0,6 ng/ml TNF- α .



Obr.13: Anti – TNF- α aktivita v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* a *Ixodes hexagonus* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$). × Rozdíl mezi vzorky slin *I. persulcatus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$). + Rozdíl mezi vzorky slin *I. hexagonus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

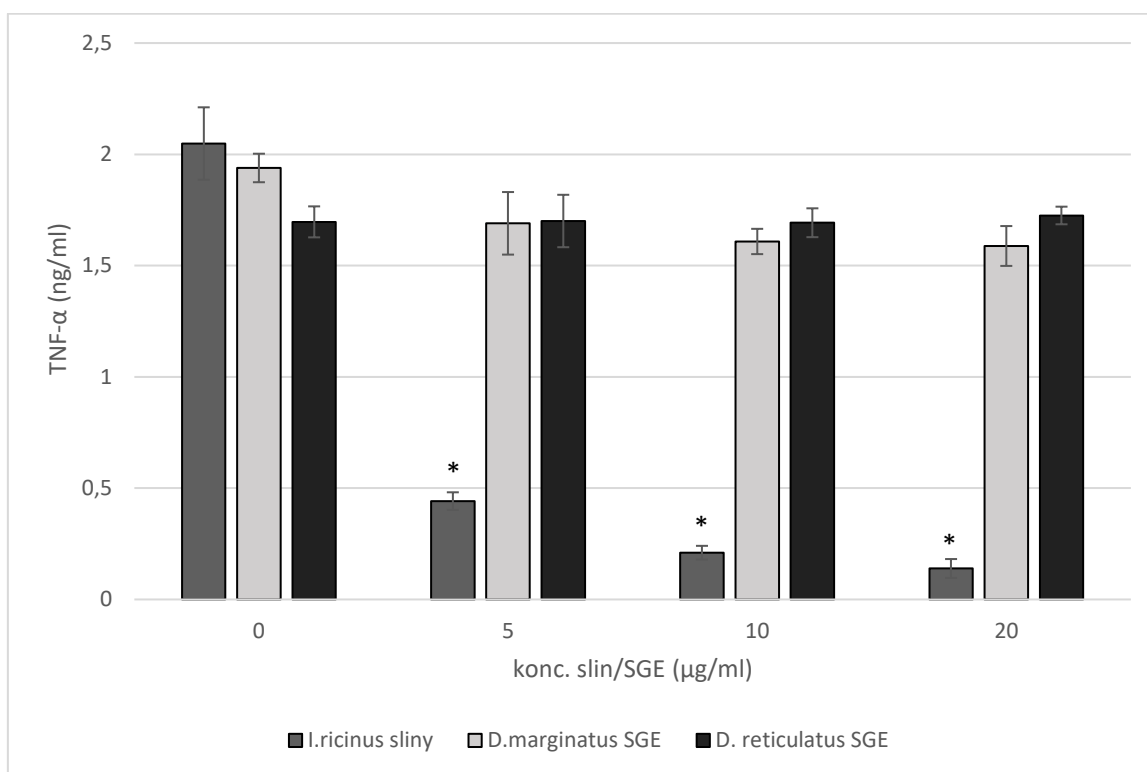
Dosavadní výsledky naznačovaly, že anti – TNF- α aktivita by mohla být charakteristická pro celý rod *Ixodes*. Z tohoto důvodu byl testován také *Ixodes scapularis* (obr. 14).



Obr. 14: Anti – TNF- α aktivita v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF - α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$). ^x Rozdíl mezi vzorky slin *I. scapularis* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Jak je patrné z obrázku 14, *Ixodes scapularis* podle předpokladu vykazuje inhibiční efekt jako předešlé druhy. Lze tedy tvrdit, že s největší pravděpodobností se neznámý inhibiční faktor vyskytuje u všech zástupců rodu *Ixodes*.

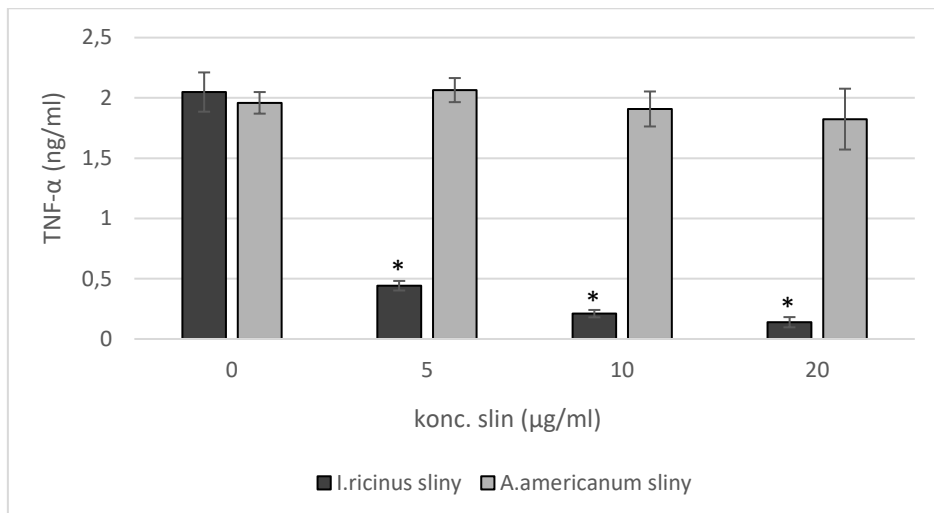
V pořadí druhým zkoumaným rodem klíšťat byl rod *Dermacentor*. Testování na inhibiční efekt proti TNF- α bylo zkoumáno u druhu *Dermacentor marginatus* a *Dermacentor reticulatus* (obr. 15). Vzhledem k morfologické stavbě hypostomu bohužel nebylo možné získat sliny, proto byl v obou případech použit SGE.



Obr. 15: Anti – TNF- α aktivita v klíšťecích slinách *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus* a *Dermacentor reticulatus* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Z obrázku vyplývá, že jak *Dermacentor marginatus* tak *Dermacentor reticulatus* postrádají mechanismus pro inhibici TNF- α .

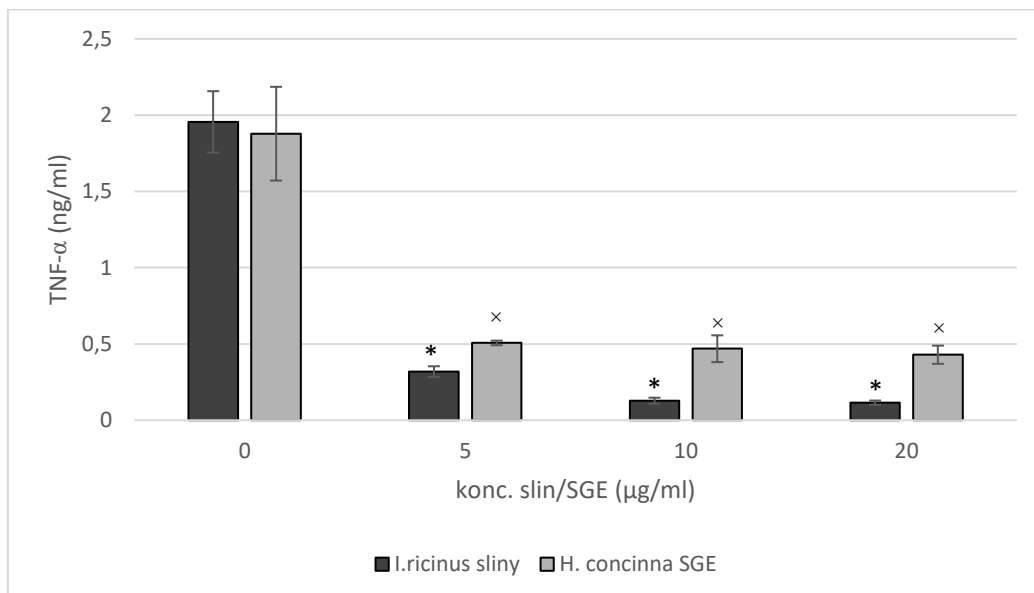
Obdobný výsledek jako u rodu *Dermacentor* byl získán v testu s americkým zástupcem dalšího rodu – *Amblyomma americanum* (obr. 16).



Obr. 16: Anti – TNF- α aktivita v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus* a *Amblyomma americanum* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

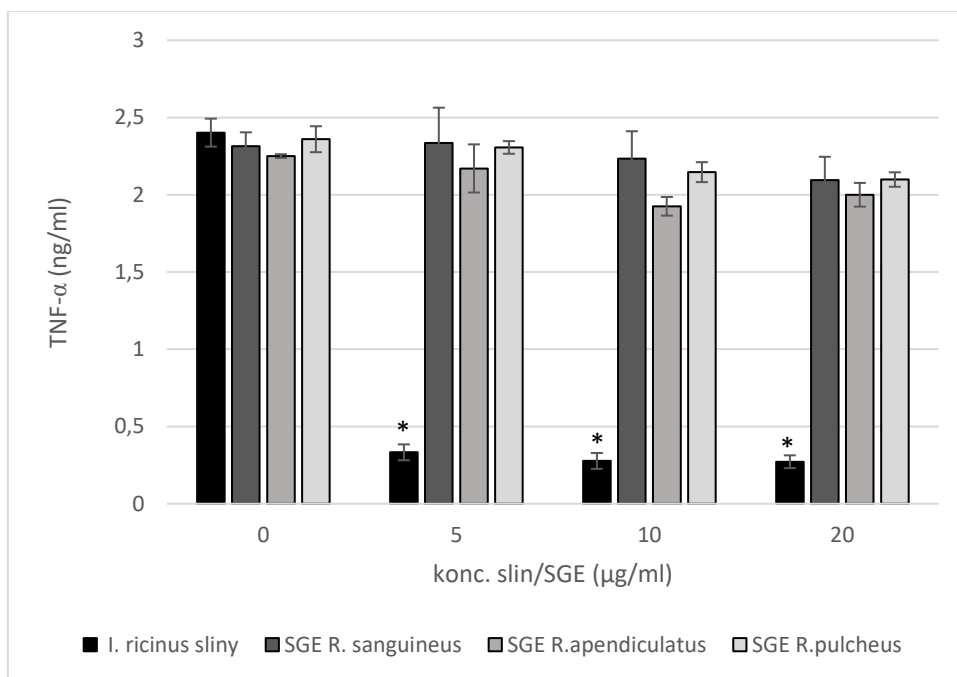
Z grafu jasně vyplývá, že oproti silné anti – TNF- α aktivitě u *Ixodes ricinus*, sliny *Amblyomma americanum* neobsahují žádný faktor s obdobnou aktivitou.

Pozitivní byl až pokus s *Haemaphysalis concinna*. Ačkoliv bylo použito SGE, které obecně není příliš preferováno, inhibice byla potvrzena, a to dokonce ve srovnatelné míře jako u slin z *Ixodes ricinus* (obr. 17).



Obr. 17: Anti – TNF- α aktivita v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus* a SGE *Haemaphysalis concinna* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF- α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$). ^x Rozdíl mezi vzorky SGE *H. concinna* s TNF- α a kontrolou bez SGE byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Poslední zkoumanou skupinou byl rod *Rhipicephalus*. Experiment proběhl u třech druhů – *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus sanguineus* a *Rhipicephalus pulchellus*. Avšak ani u jednoho ze jmenovaných druhů nebyl zaznamenán vliv na množství detekovaného TNF- α (obr. 18). Rod *Rhipicephalus* zřejmě tedy nedisponuje hledaným proteinem.



Obr. 18: Anti – TNF- α aktivita v klišťecích slinách *Ixodes ricinus* a *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus sanguineus* a *Rhipicephalus pulchellus* v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ inkubovaných 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* s TNF – α a kontrolou bez slin byl statisticky významný ($p < 0,05$).

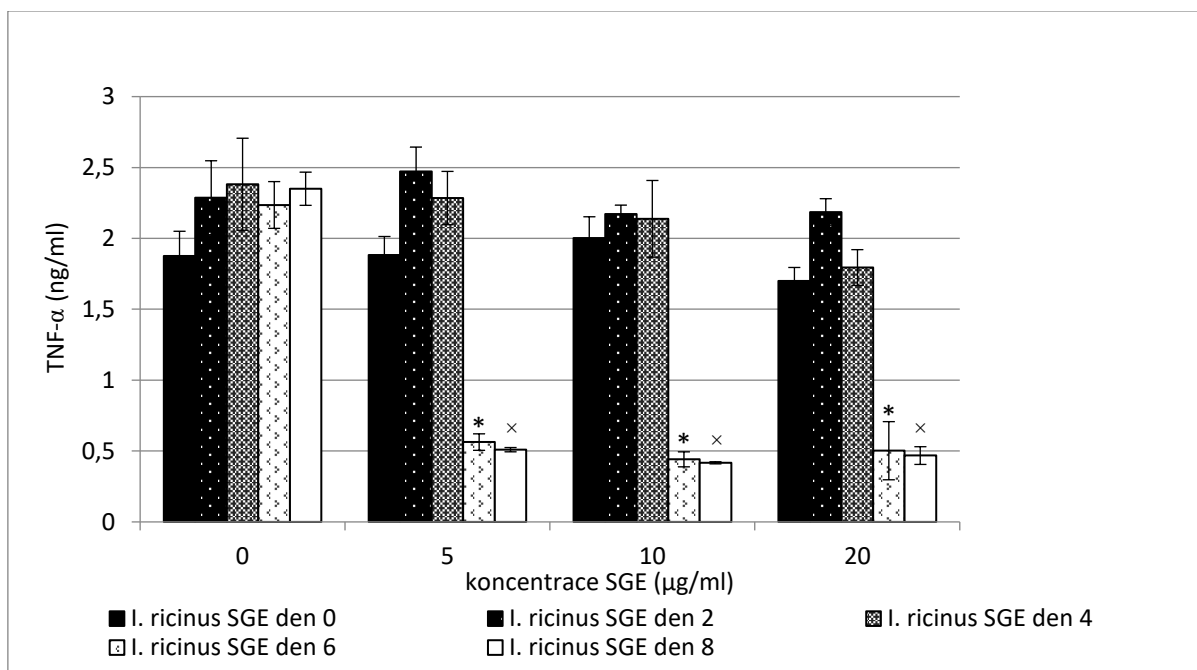
Sumarizace předešlých výsledků vedla k několika poznatkům. Anti – TNF- α aktivita byla potvrzena u *Ixodes ricinus*, nově byla objevena u *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes scapularis* a *Haemaphysalis concinna*. U zbývajících druhů, nebyl zaznamenán žádný vliv na TNF- α . Pro přehlednost je (ne)nalezená inhibiční aktivita pro jednotlivé druhy uvedena v tabulce (tab. I).

Tab. I: Anti – TNF- α aktivita (ne)potvrzená u jednotlivých druhů klíšťat.

Druh klíštěte	Anti – TNF- α aktivita
<i>Amblyomma americanum</i>	✘
<i>Dermacentor marginatus</i>	✘
<i>Dermacentor reticulatus</i>	✘
<i>Haemaphysalis concinna</i>	✓
<i>Ixodes hexagonus</i>	✓
<i>Ixodes persulcatus</i>	✓
<i>Ixodes ricinus</i>	✓
<i>Ixodes scapularis</i>	✓
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	✘
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	✘
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	✘

Dynamika výskytu TNF inhibiční aktivity během sání klíštěte

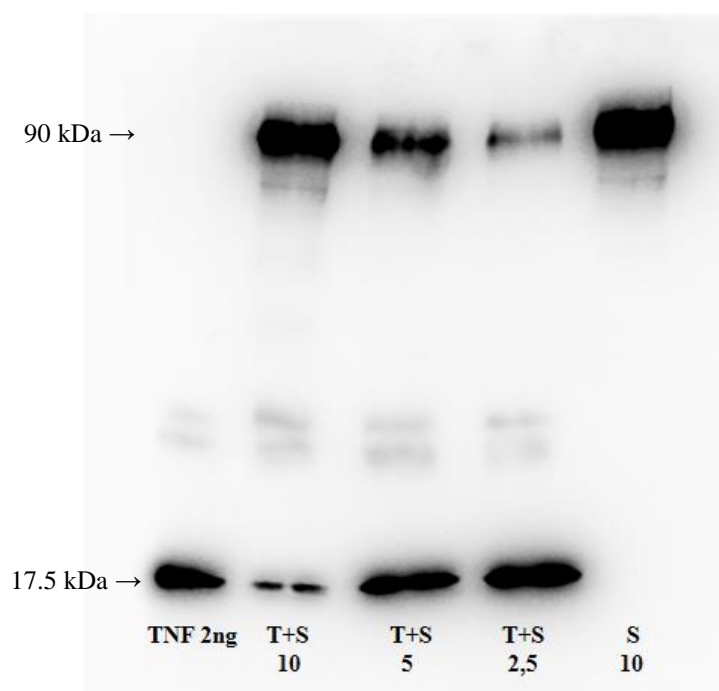
Třetím cílem práce byl výzkum dynamiky výskytu anti TNF- α proteinu u *Ixodes ricinus*. V čase 0 bylo použito SGE z nenasátých samic klíšťat, následovaly intervaly po 2, 4, 6 a 8 dnech. Přeskvapivě se inhibiční účinky projeví až v druhé polovině sání, 6. a 8. den (obr. 19).



Obr. 19: Dynamika výskytu anti – TNF- α aktivity v SGE *Ixodes ricinus* u nenasátých samic, sajících 2, 4, 6 a 8 dnů. SGE v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ byl inkubován 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací. * Rozdíl mezi vzorky *I. ricinus* SGE den 6 s TNF- α a kontrolou bez SGE byl statisticky významný ($p < 0,05$). \times Rozdíl mezi vzorky slin *I. ricinus* SGE den 8 s TNF- α a kontrolou bez SGE byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Pokus o bližší charakterizaci TNF- α inhibičního faktoru

Ve snaze izolovat TNF- α inhibiční faktor, byly proteiny ze slin *Ixodes ricinus* separovány podle velikosti a přeneseny na membránu metodou western blotting. Sliny byly opět preinkubovány ve známých koncentracích s TNF- α , rozděleny pomocí SDS-PAGE a přebloťovány na membránu. TNF by prokázán pomocí monoklonální protilátky. Podle obrázku 20 se pokus vydařil, ale interpretace zůstala nejasná.

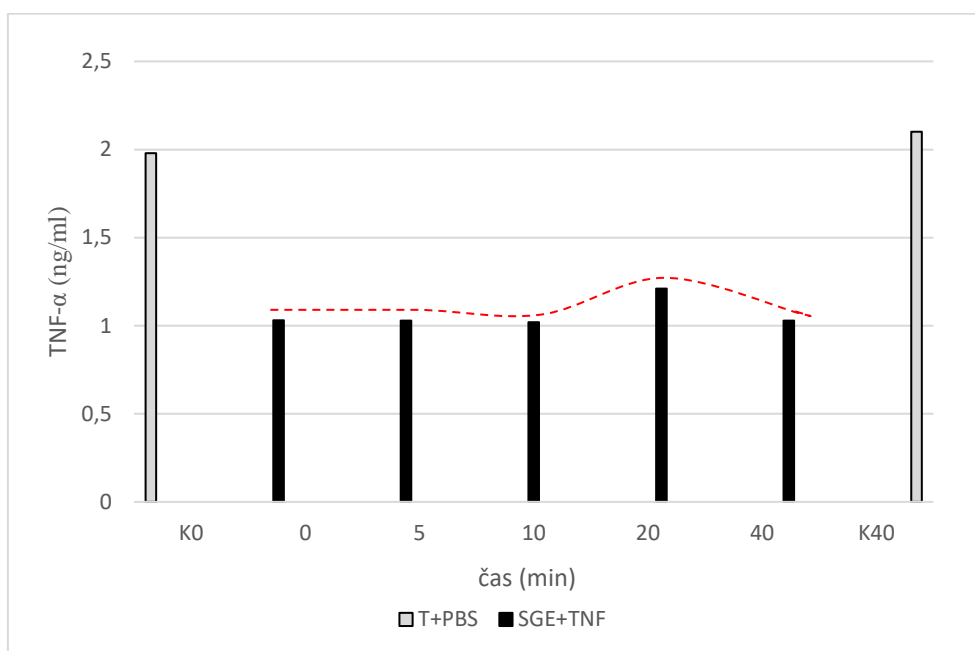


Obr. 20: SDS PAGE vzorku slin z *Ixodes ricinus* preinkubovaných s 2 ng/ml TNF- α . Sliny byly v koncentracích 20, 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$. Pozitivní kontrola obsahovala 2ng/ml TNF- α , negativní pouze 10 $\mu\text{g/ml}$ slin.

Je patrné, že se zvyšující se koncentrací slin ubývá TNF- α a v horní polovině přibývá neznámého proteinu. To by mohlo naznačovat, že se jedná o vazebný protein, ale otázkou je, proč je tento band přítomen v kontrole se samotnými slinami. Jedno z možných vysvětlení by přinesly imunoglobulin vázající proteiny nebo enzymatické štěpení, popřípadě kombinace těchto jevů. Za prvé, imunoglobulin vázající proteiny (dosud nepopsané u *Ixodes ricinus*) zachytily protilátky proti TNF- α ve western blottingu, a tak mohly být vizualizovány v podobě horního silného bandu. Za druhé TNF- α se mohl štěpit enzymem ze slin klíštěte.

Ve snaze určit, zda je neznámý faktor enzym nebo vazebný protein byl SGE ze slin *Ixodes ricinus* inkubován společně s TNF- α při teplotě 37 °C a postupně byl odebírán supernatant v časových intervalech 0, 5, 10, 20 a 40 minut. Předpokladem byla úvaha o kinetice enzymatické reakce.

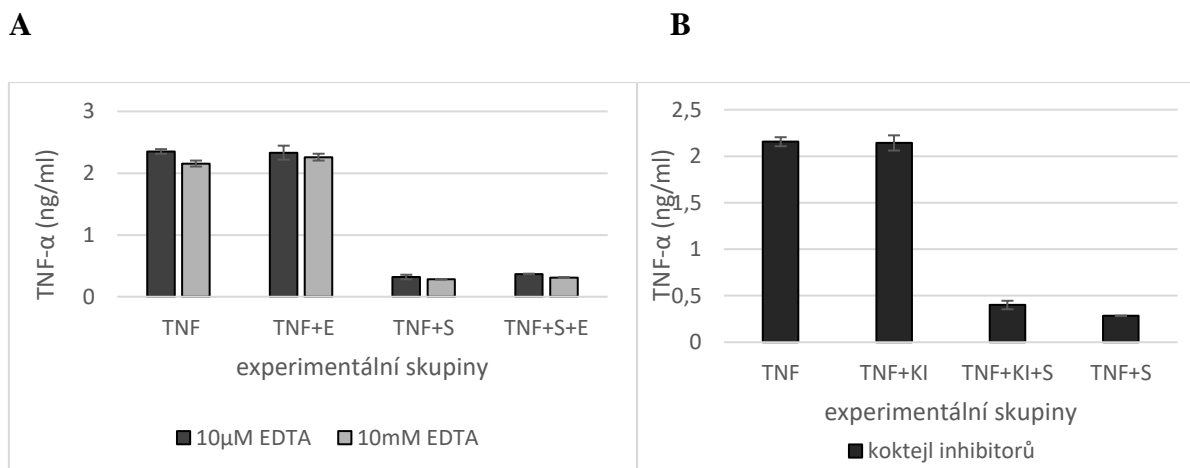
Podle Michaelise a Mentenové je počáteční rychlost reakce maximální a poté se snižuje. Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu (v našem případě TNF- α) by měla tvar hyperboly. Aby nedošlo k desinterpretaci, reakce byla zastavená uchováním na ledu. Výsledky pokusu jsou na obrázku 21.



Obr. 21: Kinetika anti – TNF- α aktivity v SGE *Ixodes ricinus* v koncentraci 10 μ g/ml inkubovaného 1,5 hodiny s 2 ng/ml rekombinantního TNF- α . Kontrola obsahovala 2 ng/ml TNF- α v PBS. Vzorby byly odebrány v časových intervalech 0, 5, 10, 20 a 40 min. Cytokin byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací.

Ačkoliv detekovaný TNF- α v SGE byl v nižší koncentraci než 2 ng/ml, rozdíl v časových intervalech se neprojevil a hladina naměřeného TNF- α byla téměř konstantní po celou dobu, jak ukazuje červená křivka. Dokonce v čase 0 byla inhibice téměř shodná jako v čase 40 minut. Takovýto výsledek je důkazem, že rychlost inhibice TNF – α je vysoká (v řádu vteřin). Další kroky proto vedly k prověření enzymatického charakteru TNF inhibitoru.

SGE z *Ixodes ricinus* byl inkubován v prvním případě s koktejlem inhibitorů proteáz (obr. 22A) a v druhém případě s inhibitorem metaloproteáz (obr. 22B), který koktejl neobsahoval. Vzápětí byl přidán TNF- α . V opačném pořadí by byl efekt inhibitorů nulový.



Obr. 22: Detekce enzymatického štěpení TNF- α v SGE *Ixodes ricinus* v koncentraci 10 μ g/ml inkubovaných 1 hodinu s (A) 10 μ M EDTA a 10 mM EDTA (B) koktejlem inhibitorů ředěným 1:100. V jednotlivých skupinách pro (A) byly 2 ng/ml TNF- α v PBS (TNF), 2 ng/ml TNF- α v PBS a 10 μ M/10 mM EDTA (TNF+E), 2 ng/ml TNF- α a 10 μ g/ml SGE (TNF+S), 2 ng/ml TNF- α v PBS, 10 μ g/ml SGE a 10 μ M/10 mM EDTA (TNF+S+E). Ve skupinách pro (B) byly 2 ng/ml TNF- α v PBS (TNF), 2 ng/ml TNF- α v PBS a koktejl inhibitorů 1:100 (TNF+KI), 2 ng/ml TNF- α v PBS, 1:100 koktejlu inhibitorů a 10 μ g/ml SGE (TNF+KI+S), 2 ng/ml TNF- α v PBS a 10 μ g/ml SGE (TNF+S). TNF- α byl detekovaný metodou ELISA a hodnoty jsou průměry triplikací.

Pokus nepotvrdil teorii o enzymatickém štěpení TNF proteiny obsaženými v SGE. Jak vzorky s koktejlem inhibitorů, tak s EDTA se očividně nelišily od kontroly, kde byl samotný SGE s TNF- α (obr. 22). Hypotéza enzymatické reakce byla tedy zamítnuta.

5. Diskuze

Klíště disponuje řadou biologicky aktivních látek, které mu usnadňují sání a přežití na hostiteli. Tyto molekuly modulují imunitu jak na úrovni nespecifické, tak i specifické odpovědi a zahrnují buněčnou i humorální složku. Regulaci uvnitř integrovaného systému hostitele za normálních okolností zprostředkovávají cytokiny, ty ovšem mohou být postižené imunomodulačními mechanismy klíštěte (stejně jako jiné složky imunity). Z tohoto hlediska klíště stimuluje produkci cytokinů směrem k Th2 buněčné subpopulaci, a naopak potlačuje Th1 (Kubeš et al., 1994).

Jeden z významných prozánětlivých cytokinů je TNF- α . V organismu je sekretovaný širokou škálou buněk, typicky jsou to monocyty, makrofágy, ale také lymfocyty, NK buňky a další (Tracey et al., 2008). Má mnoho účinků, z nichž nejznámější je indukce apoptózy. Kromě toho způsobuje zvýšenou expresi MHC I a MHC II molekul, stimuluje expresi adhezivních molekul na endotelu a produkci chemokinů v postižené tkáni (Koník et al., 2006).

Suprese TNF- α může být přímá nebo nepřímá přes sekretující buňky. Ramachandra et al. popisuje v práci „Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production“ potlačení produkce TNF- α extraktem ze slinných žláz z *Dermacentor andersoni*. Nepřímá inhibice byla nalezena také u *Ixodes ricinus* (Prevot et al., 2009), *Rhipicephalus appendiculatus* (Gwakisa et al., 2001) a v menší míře u *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis et al., 2010).

Zatímco nepřímá suprese byla pozorována u několika druhů klíšťat, přímá vazba TNF- α byla doposud známá jen u *Ixodes ricinus* (Koník et al., 2006). Proto v této práci bylo cílem ověření TNF vázající aktivity v klíštěcích slinách *Ixodes ricinus*, hledání obdobné aktivity u jiných druhů klíšťat (*Amblyomma*, *Rhipicephalus*), popis dynamiky výskytu TNF inhibiční aktivity během sání klíštěte a pokus o bližší charakterizaci TNF inhibičního faktoru.

Vhodnou, a především citlivou metodu měření množství TNF byla ELISA. Podle práce „Anti - tumour necrosis factor- α activity in *Ixodes ricinus* saliva“ (Koník et al., 2006) byla ověřena anti-TNF aktivita u *Ixodes ricinus*. Tento druh vykazoval ve vztahu ke zbylým zkoumaným druhům nejsilnější inhibiční efekt a to až 93 % v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ slin. Pozoruhodné je, že rozdíl oproti koncentracím 10 a 5 $\mu\text{g/ml}$ nebyl až tak markantní. Díky pozitivnímu výsledku se sliny používaly ve všech pozdějších pokusech jako kontrola

a současně porovnávací skupina. Síla inhibičního efektu *Ixodes ricinus* se mohla mezi kontrolami jednotlivých pokusů slabě lišit v důsledku aplikace slin z odlišných jedinců.

Hledání obdobného jevu u dalších druhů klíšťat bylo úspěšné. Celkem 11 druhů bylo podrobena testování a u následujících 4 byla anti-TNF aktivita nově objevena – *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes scapularis* a *Haemaphysalis concinna*. Ve srovnání s *Ixodes ricinus* byl efekt u všech zmíněných skupin slabší, ale ne výrazně. Podle síly inhibice je na prvním místě *Ixodes ricinus*, následuje *Haemaphysalis concinna*, za ním *Ixodes hexagonus*, *Ixodes scapularis* a *Ixodes persulcatus*. Otázkou je, zda je relevantní srovnávat míru inhibice, pakliže každý jedinec bez ohledu na druh může produkovat různou hladinu faktoru (to však nebylo předmětem práce).

Je zajímavé, že anti-TNF aktivita v klíštěcích slinách pozitivně korelovala se schopností jednotlivých druhů klíšťat sloužit jako kompetentní vektor *Borrelia burgdorferi*. Jedinou výjimku představuje *Haemaphysalis concinna* u něhož nebyl přenos borelií prokázán (Gray, 2002; Sun and Xu, 2003).

Společným znakem rodu *Ixodes* a *Haemaphysalis* (v rámci naší problematiky) je syntéza metaloproteáz ve slinách a jimi zprostředkovaná protizánětlivá modulace (Decrem et al., 2008; Francischetti et al., 2003). V experimentech s enzymatickými inhibitory se však specifické metaloproteázy štěpící TNF- α nenašly.

Výzkum dynamiky výskytu inhibičního faktoru během sání klíštěte *Ixodes ricinus* přinesl zajímavé výsledky. I když je TNF- α jeden z časných cytokinů, inhibice ve slinách se objevila až v druhé polovině sání, konkrétně 6. a 8. den. Podle výsledků (obr. 19) je míra inhibice v obou časových intervalech relativně stejná. Je známo, že v průběhu sání se mění exprese různých imunomodulačních molekul. Například SGE z *Dermacentor andersoni* potlačuje produkci IL-1 makrofágy od 0. až po 5. den, ale u stejných buněk suprimuje produkci TNF- α po celou dobu (Ramachandra et al., 1992). Možným vysvětlením průběhu dynamiky anti-TNF aktivity je preference exprese genů pro omezení produkce TNF- α v počáteční fázi sání. V druhém období, kdy je potlačena funkce makrofágů se začnou tvořit antagonisti TNF- α jako vystupňovaná imunomodulační odpověď. Jiným vysvětlením by byla spojitost mezi SAT a pozdní inhibicí. Pro druhou fázi sání klíštěte je typické rychlé zvětšení tělesného objemu a intenzivní sekrece slin do hostitele, což usnadňuje přenos patogenů.

Závěrečnou částí projektu byla snaha o bližší popis TNF inhibičního faktoru. Abychom rozhodli, zda se jedná o vazebný protein nebo enzym, zkoumali jsme kinetiku reakce. Podle obrázku 21 musela reakce proběhnout velmi rychle, protože již v čase 0 byl zaznamenán značný úbytek TNF- α , který se s přibývajícím časem neměnil. Přestože byly vzorky udržovány na ledu, aby nedošlo k chybné interpretaci, je určitá šance, že se děj obnovil při detekci ELISA testem. V této metodě se aplikované vzorky ponechají přes noc při 4 °C a měření probíhá následující den. Stejný problém mohl nastat v pokusu s inhibitory proteáz. Avšak pravděpodobnost obnovení procesu při 4 °C je zanedbatelná. V testu na enzymatické štěpení se neprokázal vliv inhibitorů proteáz, nicméně je možné, že se v SGE klíštěte *Ixodes ricinus* vyskytují ionty (nebo molekuly), které zabránily funkci inhibitorů proteáz.

Použitou technikou pro identifikaci neznámého proteinu byl western blotting. I když byly výsledky na první pohled slibné, výklad je problematický. Po vizualizaci rozdělených molekul byly patrné dva silné bandy. Jeden pro samotný TNF- α a druhý pro neznámý protein, který ale nelze jednoznačně označit jako TNF vázající, protože se vyskytoval také v kontrole pouze se slinami. Objasnění by přinesly imunoglobulin-vázající proteiny, které by zachytily značenou protilátku. Nicméně u *Ixodes ricinus* nebyly dosud popsány. V budoucích pokusech by se proto mohla jejich přítomnost testovat. Dále by bylo vhodné použít radioaktivně značený TNF- α a znovu separovat molekuly western blottingem.

Na závěr kapitoly bych chtěla zdůraznit důležitou úlohu nových poznatků v oblasti imunomodulačních mechanismů klíšťat. Vzhledem k závažným onemocněním, jaká klíšťata přenášejí, jsou intenzivní a kontinuální studie interakce klíště-hostitel nepostradatelné ve vývoji nových léků a vakcín proti přenášeným patogenům nebo dokonce proti samotným klíšťatům. Objasnění struktury TNF vázajícího faktoru by v budoucnu mohlo posloužit k navržení nových léčebných postupů u autoimunitních chorob spojených s TNF- α .

6. Závěr

- Ověření TNF vázající aktivity u *Ixodes ricinus* se podařilo ve všech pokusech pro různé koncentrace slin/SGE.
- Obdobná aktivita byla nově objevena u 4 druhů klíšťat – *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes scapularis* a *Haemaphysalis concinna*.
- Výzkum dynamiky výskytu TNF inhibiční aktivity ukázal, že se objevuje až 6. a 8. den sání.
- Pokusy o bližší charakterizaci TNF inhibičního faktoru vedly k vyloučení jeho enzymatické charakteru.

7. Přehled použitých zkratek

ASK	apoptosis signal-regulating kinase
BIP	B cell inhibitory protein
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CRM	cytokine response modifier
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELFO	elektroforéza
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	fas-associated protein with death domain
IRIS	<i>Ixodes ricinus</i> immunosuppressor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAP	mitogen-activated protein
NFκB	nuclear factor κB
PBS	phosphate buffered saline
PLAD	pre-ligand binding assembly domain
PTS	prekolostrální telecí sérum
RIP	receptor-interacting protein
SAT	saliva-activated transmission
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGE	salivary gland extract
SODD	silencer of death domain
STARI	southern tick-associated rash illness

sTNF- α	soluble tumor necrosis factor alfa
TACE	TNF alpha converting enzyme
TBS	Tris-buffered saline
tmTNF- α	transmembrane tumor necrosis factor alfa
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNF- α	tumor necrosis factor alfa
TPV-2L	Tanapox virus 2L protein
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1- associated death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
VARV	Variola virus

8. Literatura

ALEJO, A., RUIZ-ARGÜELLO, M. B., HO, Y., SMITH, V. P., SARAIVA, M., ALCAMI, A. (2006): A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(15): 5995-6000.

ALIOTA, M. T., DUPUIS, A. P., WILCZEK, M. P., PETERS, R. J., OSTFELD, R. S., KRAMER, L. D. (2014): The Prevalence of Zoonotic Tick-Borne Pathogens in *Ixodes Scapularis* Collected in the Hudson Valley, New York State. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 14(4): 245–250.

ANDERSON, B.E., SIMS, K.G., OLSON, J.G., CHILDS, J.E., PIESMAN, J.F., HAPP, C.M., MAUPIN, G.O., JOHNSON, B.J. (1993): *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49: 239–44.

ANDERSON, J. M., VALENZUELA, J. G. (2008): Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. *Ticks: Biology, Disease and Control*: 92-107.

BERGMAN, D. K., PALMER, M. J., CAIMANO, M. J., RADOLF, J. D., WIKEL, S. K. (2000): Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *Journal of Parasitology*. 86(3): 516-525.

BLACK, W. C., PIESMAN, J. (1994): Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(21): 10034-10038.

BOWMAN, A. S., NUTTALL, P. A., CHAPPELL, L. H. (2004): Ticks: biology, disease and control. *Parasitology*. 129(S1): S1-S1.

CAMACHO, A. T., PALLAS, E., GESTAL, J. J., GUITIÁN, F. J., OLMEDA, A. S., TELFORD, S. R., SPIELMAN, A. (2003): *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Veterinary Parasitology*. 112(1): 157-163.

COMMINS, S. P., SATINOVER, S. M., HOSEN, J., MOZENA, J., BORISH, L., LEWIS, B. D., PLATTS-MILLS, T. A. (2009). Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after

consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1, 3 - galactose. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123(2): 426-433.

CONSTANTIN, A., DIEUDÉ, P., LAUWERS-CANCÈS, V., JAMARD, B., MAZIERES, B., CAMBON-THOMSEN, A., et al. (2004): Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 50(3): 742-747.

DANTAS-TORRES, F. (2008): The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. 152(3): 173-185.

DANTAS-TORRES, F. (2010): Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*. 3(1): 1.

DECREM, Y., BEAUFAYS, J., BLASIOLI, V., LAHAYE, K., BROSSARD, M., VANHAMME, L., GODFROID, E. (2008): A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS Journal*. 275:1485-99.

DÉRUAZ, M., FRAUENSCHUH, A., ALESSANDRI, A. L., DIAS, J. M., COELHO, F. M., RUSSO, R. C., TEIXEIRA, M. M. (2008): Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine*. 205(9): 2019-2031.

DOMONKOS, A., UDVARDY, A., LÁSZLÓ, L., NAGY, T., DUDA, E. (2001): Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *European Cytokine Network*. 12(3): 411-419.

ECK, M., J., SPRANG, S., R. (1989): The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 264: 17595-17605.

EISSNER, G., KOLCH, W., SCHEURICH, P. (2004): Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15: 353-366.

FLYNN, J. L., GOLDSTEIN, M., M., CHAN, J., TRIEBOLD, K.J., PFEFFER, K., LOWENSTEIN, C.J., SCHRELBER, R., MAK, T.W., BLOOM, B.R. (1995): Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 2: 561-572.

- FÖLDVÁRI, G., ŠIROKÝ, P., SZEKERES, S., MAJOROS, G., SPRONG, H. (2016): *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & vectors*. 9(1): 314.
- FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M. (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*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305:869-875.
- FRAUENSCHUH, A., POWER, C. A., DÉRUAZ, M., FERREIRA, B. R., SILVA, J. S., TEIXEIRA, M. M., et al. (2007): Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Biological Chemistry*. 282(37): 27250-27258.
- GILEVA, I. P., NEPOMNYASHCHIKH, T. S., RYAZANKIN, I. A., SHCHELKUNOV, S. N. (2009): Recombinant TNF-binding protein from variola virus as a novel potential TNF antagonist. *Biochemistry (Moscow)*. 74(12): 1356-1362.
- GILLESPIE, R. D., DOLAN, M. C., PIESMAN, J., TITUS, R. G. (2001): Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Immunology*. 166(7): 4319-4326.
- GOODMAN, J. L., DENNIS, D. T., SONENSHINE, D. E. (2005): Tick-borne diseases of humans. Washington, D.C.: ASM (pp. 3).
- GRAY, J. S. (1998): Review the ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental and Applied Acarology*. 22(5): 249-258.
- GRAY, J.S., KAHL, O., LANE, R.S., STANEK, G. (Eds.) (2002): Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. New York: CABI Publishing (pp. 92-99).
- GWAKISA, P., YOSHIHARA, K., TO, T. L., GOTOH, H., AMANO, F., MOMOTANI, E. (2001): Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA - 4 cells. *Veterinary Parasitology*. 99(1): 53-61.
- HAIDER, S., KNÖFLER, M. (2009): Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta*. 30(2): 111-123.

HÁJKOVÁ, Z., ROSICKÝ, B. *Roztoči a klíšřata škodící zdraví člověka*. Praha: Academia, 1979. Cesta k věděni.

HAJNICKÁ, V., KOCÁKOVÁ, P., SLÁVIKOVÁ, M., SLOVÁK, M., GAŠPERÍK, J., FUCHSBERGER, N. AND NUTTALL, P. A. (2001): Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology*, 23: 483–489.

HANNIER, S., LIVERSIDGE, J., STERNBERG, J. M., BOWMAN, A. S. (2004): Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology*. 113(3): 401-408.

HEEL, D. A., UDALOVA, I. A., DE SILVA, A. P., MCGOVERN, D. P., KINOUCI, Y., HULL, J., KWIATKOWSKI, D. et al. (2002): Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF- κ B transcription factors. *Human Molecular Genetics*. 11(11): 1281-1289.

HELL, W., ESSIG, A., BOHNET, S., GATERMANN, S., MARRE, R. (1993): Cleavage of tumor necrosis factor- α by *Legionella exoprotease*. *Apmis*. 101(1-6): 120-126.

HORIUCHI, T., MITOMA, H., HARASHIMA, S. I., TSUKAMOTO, H., SHIMODA, T. (2010): Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 49(7): 1215-1228.

HSU, H., XIONG, J., GOEDEL, D. V. (1995): The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*. 81(4): 495-504.

CHAN, F. K. M., CHUN, H. J., ZHENG, L., SIEGEL, R. M., BUI, K. L., LENARDO, M. J. et al. (2000): A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science*. 288(5475): 2351-2354.

CHEN, G., GOEDEL, D. V. (2002): TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*. 296(5573): 1634-1635.

CHEN, X., XUN, K., CHEN, L., WANG, Y. (2009): TNF- α , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochemistry and Function*. 27(7): 407-416.

- CHO, K. H., SHIN, S. Y., LEE, H. W., WOLKENHAUER, O. (2003): Investigations into the analysis and modeling of the TNF α -mediated NF- κ B-signaling pathway. *Genome Research*. 13(11): 2413-2422.
- JIANG, Y., WORONICZ, J. D., LIU, W., GOEDDEL, D. V. (1999): Prevention of Constitutive TNF Receptor 1 Signaling by Silencer of Death Domains. *Science*. 283(5401): 543-546.
- JONES, L. D., HODGSON, E., NUTTALL, P. A. (1989): Enhancement of Virus Transmission by Tick Salivary Glands. *Journal of General Virology*. 70: 1895-1898.
- JONES, L. D., KAUFMAN, W. R., NUTTALL, P. A. (1992): Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 48(8): 779-782.
- KAPLAN, G., FREEDMAN, V. H. (1996): The role of cytokines in the immune response to tuberculosis. *Research in Immunology*. 147(8-9): 565-572.
- KIM, E. Y., PRIATEL, J. J., TEH, S., TEH, H. (2006): TNF Receptor Type 2 (P75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*: 176(2): 1026–1035.
- KONÍK, P., SLAVÍKOVÁ, V., SALÁT, J., ŘEZNÍČKOVÁ, J., DVOROŽŇÁKOVÁ, E. and KOPECKÝ, J. (2006): Anti-tumour necrosis factor- α activity in *Ixodes ricinus* saliva. *Parasite Immunology*. 28: 649–656.
- KOPECKÝ, J., KUTHEJLOVÁ, M. (1998): Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology*. 20(4): 169-174.
- KOTSYFAKIS, M., HORKA, H., SALAT, J., ANDERSEN, J. F. (2010): The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular Microbiol*. 77: 456-470.
- KUBEŠ M., FUCHSBERGER N., LABUDA M., ZUFFOVÁ E., NUTTALL P. A. (1994): Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. *Immunology*. 82(1): 113-116.

- LEDIN, K. E., ZEIDNER, N. S., RIBEIRO, J. M. C., BIGGERSTAFF, B. J., DOLAN, M. C., DIETRICH, G., PIESMAN, J. (2005): Borreliacidal activity of saliva of the tick *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology*. 19(1): 90-95.
- LEVI, M., DE JONGE, E., VAN DER POLL, T. (2006): Plasma and plasma components in the management of disseminated intravascular coagulation. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 19(1): 127-142.
- MÄNNEL, D. N., ECHTENACHER, B. (1999): TNF in the inflammatory Response. CD14 in the Inflammatory Response. Basel: KARGER (pp.141-142).
- MANS, B. J., DE KLERK, D., PIENAAR, R., LATIF, A. A. (2011): *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. *PLOS One*. 6(8): e23675.
- MAREŠ, M., KOPÁČEK, P. (2008): Molekulární pohled do světa klíšťat. *Vesmír*. 87: 670-671.
- MEDLOCK, J. M., HANSFORD, K. M., BORMANE, A., DERDAKOVA, M., ESTRADA-PEÑA, A., GEORGE, J. C., et al. (2013): Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*. 6(1): 1.
- MORITA, C., HORIUCHI, T., TSUKAMOTO, H., HATTA, N., KIKUCHI, Y., ARINOBU, Y. et al. (2001): Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese: Molecular and functional analysis. *Arthritis & Rheumatism*. 44(12): 2819-2827.
- NEDWIN, G. E., NAYLOR, S. L., SAKAGUCHI, A. Y., SMITH, D., JARRETT-NEDWIN, J., PENNICA, D., GRAY, P. W. (1985): Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Research*. 13(17): 6361-6373.
- NUTALL, P. A. (1999): Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 289(5-7): 492-505.
- NUTTALL, P. A., LABUDA, M. (2004): Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*. 129(S1): S177-S189.

- PERRY, B. D., KRUSKA, R., LESSARD, P., NORVAL, R. A. I., KUNDERT, K. (1991): Estimating the distribution and abundance of *Rhipicephalus appendiculatus* in Africa. *Preventive Veterinary Medicine*: 11(3-4): 261-268.
- PIESMAN, J., GERN, L. (2004): Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*. 129(S1): S191-S220.
- PREVOT, P. P., BESCHIN, A., LINS, L., BEAUFAYS, J., GROSJEAN, A., BRUYS, L., ADAM, B., BROSSARD, M., BRASSEUR, R., ZOUAOUI BOUDJELTIA, K., VANHAMME, L., GODFROID, E. (2009): Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS Journal*. 276:3235-3246.
- RAHMAN, M. M., JENG, D., SINGH, R., COUGHLIN, J., ESSANI, K., MCFADDEN, G. (2009): Interaction of human TNF and β 2-microglobulin with Tanapox virus-encoded TNF inhibitor, TPV-2L. *Virology*. 386(2), 462-468.
- RAHMAN, M. M., MCFADDEN, G. (2006): Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLOS Pathogens*. 2(2): e4.
- RAMACHANDRA R. N., WIKEL S. K. (1992): Modulation of Host-Immune Responses by Ticks (Acari: Ixodidae): Effect of Salivary Gland Extracts on Host Macrophages and Lymphocyte Cytokine Production. *J. Med. Entomol.* 29: 818-826.
- RIBEIRO J. M. C. (1987): *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology*. 64:347-353.
- RIBEIRO J. M. C., WEIS J. J., TELFORD S. R. (1990): Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology*. 70: 382-388.
- RIBEIRO, J. M., MATHER, T. N. (1998): *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*. 89: 213-221.
- SILVA, M. C., SILVA, T. L., SILVA, M. V., MOTA, C. M., SANTIAGO, F. M., FONSECA, K. C. et al. (2016): Interaction between TNF and BmooMP-Alpha-I, a Zinc Metalloprotease Derived from *Bothrops moojeni* Snake Venom, Promotes Direct Proteolysis of This Cytokine: Molecular Modeling and Docking at a Glance. *Toxins*. 8(7): 223.

- SUN, Yi and XU, Rongman (2003): Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. *Experimental & Applied Acarology*. 31(1-2): 151.
- ŠIMO, L., KOCÁKOVÁ, P., SLÁVIKOVÁ, M., KUBEŠ, M., HAJNICKÁ, V., VANČOVÁ, I., SLOVÁK, M. (2004): *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodidae) female feeding in laboratory. *Biologia, Bratislava*. 59(5): 655-660.
- TENG, K. F., JIANG, Z. J. (1991): Economic insect fauna of China. Fasc 39, Acari: Ixodidae. *Science, Beijing*. 52: 349.
- THEISS, A. L., SIMMONS, J. G., JOBIN, C., LUND, P. K. (2005): Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 280(43): 36099-36109.
- TSYRENDORZHIEV, D. D., ORLOVSKAYA, I. A., SENNIKOV, S. V., TREGUBCHAK, T. V., GILEVA, I. P., TSYRENDORZHIEVA, M. D., & SHCHELKUNOV, S. N. (2014): Biological Effects of Individually Synthesized TNF-Binding Domain of Variola Virus Crmb Protein. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 157(2) 249-252.
- USPENSKY, I., GARRUTO, R. M., GOLDFARB, L. (2003): The taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae) in the Sakha Republic (Yakutia) of Russia: distributional and reproductive ranges. *Journal of Medical Entomology*. 40(1): 119-122.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., SCHEURICH, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*. 10(1): 45-65.
- WALKER, A. R. (2003): Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh: Bioscience Reports (pp. 3-210).
- WALTER, M., BRUGGER, K., RUBEL, F. (2016): The ecological niche of *Dermacentor marginatus* in Germany. *Parasitology Research*. 115(6): 2165-2174.
- WANG, L., DU, F., WANG, X. (2008): TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 133(4): 693-703.
- WEEKS, P. (2000): Red-billed oxpeckers: vampires or tickbirds? *Behavioral Ecology*. 11(2): 154-160.

ZHANG, R., XU, Y., EKMAN, N., WU, Z., WU, J., ALITALO, K., MIN, W. (2003): Etk/Bmx Transactivates Vascular Endothelial Growth Factor 2 and Recruits Phosphatidylinositol 3-Kinase to Mediate the Tumor Necrosis Factor-induced Angiogenic Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 278(51): 51267-51276.

9. Obrázky

ESTEVE-GASSENT, M. D., CASTRO-ARELLANO, I., FERIA-ARROYO, T. P., PATINO, R., LI, A. Y., MEDINA, R. F., et al. (2016): Translating ecology, physiology, biochemistry, and population genetics research to meet the challenge of tick and tick-borne diseases in north america. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 92(1): 38-64.

RUBEL, F., BRUGGER, K., PFEFFER, M., CHITIMIA-DOBLER, L., DIDYK, Y. M., LEVERENZ, S. et al. (2016): Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(1): 224-233.