

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Vakcinační potenciál cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus***

**Bc. ADÉLA HARCUBOVÁ**

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

**České Budějovice 2012**

## **Diplomová práce**

Harcubová A., 2012: Vakcinační potenciál cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Vaccine potentiality of cystatin from tick *Ixodes ricinus*, Mgr. Tehsis, in Czech] - 39p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, the Czech Republic.

### **Annotation:**

Ticks belong to the ectoparasites which are dangerous for the human beings because of the transmission of bacterial, viral, and protozoan pathogens. The development of a vaccine against tick is very important. Cystatins play important role in tick digestion and they have an immunomodulation effects. For this reason cystatins are possible candidates for this vaccines. This thesis focuses on experimental mice vaccination with recombinant cystatin from *Ixodes ricinus*.

Tato práce byla financována z grantu: MŠMT LC06009

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a 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 27.4.2012

.....  
Bc. Adéla Harcubová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svým školitelům, Prof. RNDr. Janu Kopeckému CSc. a RNDr. Jiřímu Salátovi PhD., za možnost vytvořit tuto práci, odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a ochotu kdykoliv pomoci. Dále děkuji Janu Erhartovi za pomoc při práci s klíšťaty, RNDr. Petru Kopáčkovi CSc. za pomoc s gelovou chromatografií. Díky patří i ostatním lidem z laboratoře, kteří mi pomáhali kdykoliv jsem si s něčím nevěděla rady. Nemalé dík patří také mé rodině a přátelům za veškerou podporu při tvorbě této práce.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1 <i>Ixodes ricinus</i> (klíště obecné) .....	1
1.2 Odpověď hostitele na sání klíštěte .....	2
1.3 Sliny klíštěte .....	2
1.3.1 Inhibice koagulace a vasokonstrikce .....	3
1.3.2 Suprese imunitní odpovědi hostitele .....	3
1.3.3 Slinami aktivovaný přenos .....	5
1.4 Vakcíny proti klíšťatům .....	6
1.4.1 Exponované antigeny .....	6
1.4.2 Skryté antigeny .....	6
1.4.3 Duální vakcíny (dual action vakcíny) .....	7
1.4.4 Přenos blokuující vakcíny (trans-block vakcíny) .....	7
1.5 Cystatiny .....	8
1.5.1 Cystatiny v organismech .....	8
1.5.2 Cystatiny v klíšťatech .....	9
1.5.3 Cystatin klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> .....	10
<b>2. Cíle práce</b> .....	11
<b>3. Materiál a metody</b> .....	12
3.1 Laboratorní zvířata .....	12
3.1.1 Myši .....	12
3.1.2 Klíšťata .....	12
3.2 Expres a purifikace proteinu .....	12
3.2.1 Rekombinantní bakulovirus s genem pro cystatin .....	12
3.2.2 Příprava zásobního viru pro expres .....	13
3.2.3 Expres a purifikace cystatinu <i>Ixodes ricinus</i> .....	14
3.2.4 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza) .....	14
3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů: Metoda podle Bradfordové .....	15
3.3 Imunizační pokusy .....	15
3.3.1 Příprava vakcíny a imunizace myší .....	15
3.3.2 Schéma vakcinačních pokusů .....	15
3.3.3 ELISA .....	16

3.3.4 Odběr slin klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> .....	17
3.3.5 Vyhodnocení výsledků .....	17
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>18</b>
4.1 Purifikace proteinu .....	18
4.2 Imunizační pokusy .....	20
4.2.1 Souhrnné výsledky základních imunizačních pokusů .....	21
4.2.2 Statistické vyhodnocení účinnosti vakcinace .....	24
4.2.3 Vyhodnocení vlivu sání klíšťat na obsah protilátek .....	25
4.2.4 Vyhodnocení vlivu imunizace cystatinem na rozpoznatelnost dalších proteinů ve slinách .....	27
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>33</b>
<b>7. Přehled literatury</b> .....	<b>34</b>

# 1. Úvod

## 1.1 *Ixodes ricinus* (klíště obecné)

*Ixodes ricinus* (klíště obecné) je obligátní krevsající ektoparazit. Patří do řádu *Ixodida*, čeledi *Ixodidae*. Vyskytuje se v mírném pásu severní polokoule, po celé Evropě, v Asii a můžeme ho nalézt i v některých oblastech severní Afriky. Preferuje vlhké biotopy jako jsou vlhčí louky a pastviny, listnaté nebo smíšené lesy s bohatým podrostem (Nuttall et al., 2000).

Klíště obecné patří mezi trojhostitelská klíšťata a během svého životního cyklu projde čtyřmi vývojovými stadii: vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa a dospělec. Každé stadium saje pouze jednou a vždy na jiném hostiteli. V pokožce je klíště ukotveno pomocí ústního ústrojí s hypostomem, pro větší upevnění dochází k vylučování cementu kolem hypostomu. Tato bílkovinná hmota obsahuje kromě jiných látek také proteiny podobné kolagenu a keratinu, což jsou hlavní složky pokožky obratlovců (Nuttall et al., 2000). Celé sání je charakterizováno třemi fázemi. První fáze je přípravná, ukotvovací a trvá přibližně 24 hodin. Následuje fáze pomalého sání, kdy klíště začíná sát krev. V poslední fázi, která nastává 24-36 hodin před úplným nasátím, klíště přijímá velké množství krve a zvětšuje svůj objem (Tsuda et al., 2001), zároveň se střídá fáze sání a produkce slin (Nuttall et al., 2000). Každé stadium potřebuje ke svému vývoji přibližně jeden rok. Larvy sají na ptácích a drobných savcích, nymfy na středně velkých hlodavcích a dospělec převážně na velkých savcích. Po každém sání následuje svlékání a přeměna v další stadium (v případě larev a nymf), oplodněná samice po nasátí naklade vajíčka a hyne (Volf, Horák a kol., 2007).

*Ixodes ricinus* přenáší především dva významné patogeny nebezpečné pro člověka. Jedná se o bakterii *Borelia burgdorferi* sensu lato, původce Lymeské choroby a virus klíšťové encefalitidy (TBE virus - Tick Borne Encephalitis virus) (Nuttall, 1999). Místo přisátí je významně ovlivňováno farmakologicky aktivními látkami obsaženými ve slinách klíšťat, čímž je usnadněn přenos a přežití patogena (Nuttall, Labuda, 2004).

## 1.2 Odpověď hostitele na sání klíštěte

Každý hostitel se snaží zabránit ztrátám krve a to hemokoagulací a zúžením cév neboli vasokonstrikcí. Proti sání klíštěte se dále brání imunitními a zánětlivými reakcemi. Odpověď na sání klíštěte na imunním hostiteli charakterizujeme jako kožní bazofilní hypersenzitivní reakci, která zabraňuje sání a zamezuje svlékání. Klíště uhyne vyhladověním a vyschnutím. Primární odpověď naivního hostitele je zánětlivá reakce, která však není dostatečně rychlá, aby postihla sající klíště a zabránila dokončení sání (Singh, Girschick, 2003).

Antigeny obsažené v klíštěcích slinách a v cementu jsou přítomné v kůži několik dní a jsou rozpoznávány Langerhansovými buňkami, což jsou dendritické buňky přítomné v pokožce. Následně migrují do drénujících lymfatických uzlin, kde tyto antigeny prezentují T-lymfocytům. Cytokiny produkované Th1 subpopulací T-lymfocytů, IL-2 a INF- $\gamma$ , spouštějí zánětlivou a protilátkovou odpověď (Singh & Girschick, 2003). Převládajícím buněčným typem, který infiltruje místo kousnutí klíštěte, jsou bazofily (Askenase, 1977). Nejvýznamnější adaptivní imunitní reakce proti klíšťatům je kožní bazofilní hypersenzitivita, forma DTH reakce (Brown & Askenase, 1983). Objevuje se také odpověď homocytotropních protilátek. Vytvářené protilátky, hlavně IgE, jsou schopné vázat se na Fc receptor na bazofilech a žírných buňkách. Po interakci s antigeny slin spustí jejich degranulaci a uvolnění několika biologicky aktivních látek (Matsuda et al., 1990). Zvláštní význam mají hlavně histamin a serotonin (Matsuda et al., 1985). Histamin způsobuje roztažení cév a je hlavním mediátorem zánětu. Dojde k otoku a zarudnutí v místě sání klíštěte. Histamin také omezuje sání a potlačuje slinění klíštěte. Zvyšuje hladinu cytokinu TNF $\alpha$ , který potlačuje infekci *Borrelia burgdorferi*, a aktivuje NK buňky. Degranulace může být také spuštěna navázáním anafylatoxinů, které vznikají při aktivaci komplementu alternativní cestou (Nuttal & Labuda, 2004).

## 1.3 Sliny klíštěte

Klíšťata musí obranným reakcím hostitele odolávat. Proto se u nich vyvinulo mnoho mechanismů, které inaktivují molekuly a buňky imunitního systému hostitele a brzdí rozvoj těchto obranných reakcí. To se děje díky obrovskému množství bioaktivních látek obsažených ve slinách a také cementu, který neslouží pouze k ukotvení klíštěte v hostiteli. Tyto látky jsou uvolňovány během sání (Mathias et al., 2011).

Jedná se o řadu proteinů, glykoproteinů, lipoproteinů nebo lipidů, které fungují jako inhibitory koagulace, vasodilatační látky (Singh, Girschick, 2003; Mathias et al., 2011) a imunosupresivní látky (Mathias et al., 2011).

### 1.3.1 Inhibice koagulace a vasokonstrikce

Hostitel se přirozeně brání ztrátám krve. Tato obrana zahrnuje stažení cév (vasokonstrikci), čímž dojde ke snížení průtoku krve, adhezi a agregaci trombocytů a další koagulační procesy (Singh & Girschick, 2003). Molekuly obsažené ve slinách inhibují koagulaci, potlačují agregaci krevních destiček či stimuluji fibrinolýzu.

Koagulace je koordinována proteolytickými enzymy, jejichž funkce je regulována serpiny (inhibitory serinových proteináz). Jsou to molekuly, které mají velmi podobnou strukturu, ale mnoho rozdílných funkcí (Mulenga et al., 2001). Mezi serinové proteinázy patří například katepsin G (indukuje agregaci krevních destiček) a chymáza. Nedávná studie prokázala, že protein obsažený ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*, pojmenovaný serpin-2 (IRS-2), inhibuje funkci těchto dvou molekul. To má za následek potlačení agregace trombocytů a snížení aktivity trombinu (Chmelař et al., 2011). Serpiny jsou obsaženy i ve slinách jiných druhů klíšťat. Dalším serpinem z klíštěte *Ixodes ricinus* u kterého byl popsán vliv na koagulaci a fibrinolýzu je Iris (*I. ricinus* imunosupresor) (Prevot et al., 2009). Analyzovány byly také například u klíštěte *Amblyoma americanum* (Chalaise et al., 2010) nebo *Ixodes scapularis* (Mulenga et al., 2009). Jinou molekulou objevenou u *I. scapularis* u které byla prokázána antikoagulační aktivita je protein P23, který výrazně zpomaluje tvorbu trombinu (Schuijt et al., 2011). U druhu *Ornithodoros savignyi* byla ve slinách prokázána přítomnost atikoagulantů inhibujících funkci koagulačního faktoru Xa a trombinu (Gaspar et al., 1995). Dalšími důležitými látkami jsou prostaglandiny, které brání stažení cév a naopak cévy roztahují, čímž zvyšují přítok krve. Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) je navíc inhibitorem agregace krevních destiček (Guo, Booth et al., 2009). Jiný inhibitor agregace trombocytů, pojmenovaný disagregin, byl izolován ze slinných žláz klíštěte *Ornithodoros moubata* (Karczewski et al., 1994).

### 1.3.2 Suprese imunitní odpovědi hostitele

Složky slinného sekretu klíštěte mohou ovlivňovat jednotlivé funkce a buňky imunitního systému hostitele: mohou potlačovat aktivaci komplementu, fagocytózu, proliferaci T lymfocytů, aktivitu NK buněk, funkci dendritických buněk, produkci cytokinů a podobně (Mathias et al., 2011).



Velice důležitou molekulou přítomnou ve slinách klíšťat druhu *Ixodes scapularis* a *Ixodes ricinus* je Salp15. Jedná se o imunosupresivní látku zabraňující aktivaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Juncadela et al., 2007). Specificky se váže na CD4 koreceptor savčích T buněk. Po tomto navázání potlačuje funkci T buněčného receptoru (TCR). Je zodpovědný také za omezení produkce IL2 během imunitní odpovědi (Garg et al., 2006; Juncadella et al., 2007). Bylo také prokázáno, že Salp15 zabraňuje produkci zánětlivých cytokinů lidskými dendritickými buňkami navázáním se na lektinový receptor DC-SIGN a tím ovlivňuje adaptivní imunitní odpověď člověka (Hovius et al., 2008). Dalšími prokázanými T buněčnými inhibitory jsou např. p36 nebo Iris (Titus et al., 2005) a také IL-2 vázající protein, jehož přítomnost byla prokázána ve slinách *Ixodes scapularis*. Schopnost vázat IL-2 je jednoduchý mechanismus suprese proliferace a aktivity T buněk, které jsou závislé na stimulaci IL-2 (Gillespie et al., 2001).

Další významnou imunosupresivní molekulou obsaženou ve slinných žlázách klíšťat rodu *Ixodes* je již výše zmíněný inhibitor serinových proteináz Iris. Kromě vlivu na hemokoagulaci působí také na různé buňky imunitního systému (př. T-lymfocyty, makrofágy) a to především tak, že inhibuje produkci některých cytokinů. Jedná se například o INF- $\gamma$  produkovaný Th1 subpopulací lymfocytů, IL-6 a IL-8 produkované makrofágy (Leboulle et al., 2002). Bylo také prokázáno, že se váže na makrofágy a potlačuje produkci TNF- $\alpha$  těmito buňkami (Prevot et al., 2002). Dalším z rodiny serpinů s imunosupresivními účinky je také výše zmíněný IRS-2, který potlačuje zánětlivou reakci tím, že blokuje příliv neutrofilů do tkáně (Chmelař et al., 2010).

Důležitými buňkami v imunitě hostitele jsou polymorfonukleární leukocyty neboli neutrofilů. Jako první migrují do místa sání, jejich funkcí je především fagocytóza a eliminace spirochet *Borrelie burgdorferi* a produkce superoxidů (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Sliny klíšťat rodu *Ixodes* snižují expresi integrinů, povrchových buněčných receptorů zodpovědných za migraci a adhezi buněk k podkladu. Tím tedy inhibují adhezi neutrofilů a snižují jejich schopnost účinně zabít spirochety (Montgomery et al., 2004). Ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes scapularis* byly identifikovány dva proteiny (ISL 929, ISL 1373), které významně redukuje expresi  $\beta$ 2 integrinu (CD18) a potlačují produkci O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Guo et al., 2009).

Proteiny narušující funkci komplementového systému hostitele byly charakterizovány u mnoha druhů klíšťat. U klíštěte *Ornithodoros moubata* je to protein pojmenovaný OmCI, který inhibuje aktivaci C5 složky komplementu (Schuijt et al., 2011). Sliny klíštěte *I. scapularis* obsahují antikomplementové molekuly nazvané Isac a Salp 20. Obě blokuje aktivaci komplementu alternativní cestou, potlačují stabilizaci a funkci C3-konvertázy

(Tyson et al., 2007; Valenzuela et al., 2000). Další slinný protein popsáný u *Ixodes scapularis* je P8, později pojmenovaný TSLPI (Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor). Z názvu vyplývá, že je inhibítozem lektinové cesty aktivace komplementu, v důsledku toho dochází ke zhoršení fagocytózy patogenů neutrofilů (Schuijt et al., 2011). Komplement je pro hostitele důležitý především k eradikaci *Borrelie burgdorferi*. Díky těmto molekulám se šance na přenos patogena zvyšuje. Navíc mají borelie na svém vnějším povrchu lipoproteinové molekuly, které je chrání před lytickými účinky komplementu (Hellwage et al., 2000).

U slin klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* byl prokázán vliv na diferenciaci, migraci a maturaci dendritických buněk a následnou produkci cytokinů těmito buňkami. Zodpovědné jsou za to nejspíše dvě neproteinové molekuly. Jednou z nich je purinový nukleosid adenosin (Ado), který inhibuje produkci zánětlivých cytokinů (IL-12 a TNF $\alpha$ ) a naopak stimuluje tvorbu protizánětlivých cytokinů (IL-10). Stejný efekt měla i druhá identifikovaná látka, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), který navíc potlačoval diferenciaci dendritických buněk z buněčných prekurzorů v krvi (Oliveira et al., 2011).

Všeobecně složky slinného sekretu zamezují zrání a migraci dendritických buněk do místa zánětu, jejich prezentaci antigenu T lymfocytům a podporují rozvoj Th2 imunitní odpovědi. Tyto účinky mohou představovat hlavní mechanismus úniku klíšťat před imunitní odpovědí hostitele (Skallová et al., 2008).

### 1.3.3 Slinami aktivovaný přenos

Klíčovým jevem úspěšného přenosu patogenů na hostitele je tzv. slinami aktivovaný přenos (SAT - Saliva Activated Transmission). Je to schopnost patogenů zneužívat farmakologické vlastnosti klíštěcích slin. Tento jev byl identifikován nejenom u klíšťat, ale i u jiných patogenů a jejich hmyzích přenašečů, např. *Leishmania* a přenašeč *Phlebotomus*. Poprvé byl popsán u Thogoto viru, který přenáší *Rhipicephalus appendiculatus*. Pokusy byly prováděny na morčatech a staly se prvním přímým důkazem toho, že extrakt ze slinných žláz (SGE) klíštěte může přispívat k přenosu tohoto viru. V přírodě se na hostiteli živí jak infikovaná, tak neinfikovaná klíšťata a infekce se přenáší na další klíště právě při sání na infikovaném hostiteli (Jones et al., 1989; Nuttal & Labuda, 2004).

SAT faktory jsou přítomny pouze ve slinách několik dní sajícího klíštěte. Liší se podle druhu přenašeče, patogena i hostitele a pravděpodobně to nejsou antikoagulační, protizánětlivé ani antikomplementové faktory slin (Nuttal & Labuda, 2004).

Výše zmíněný protein Salp15 je příkladem SAT faktoru. Váže se na povrchový receptor OspC *Borrelie burgdorferi*. Tato interakce usnadňuje přenos infekce z vektora na hostitele, chrání bakterii před účinky protilátek a komplementu. Na myším modelu bylo prokázáno, že imunizace tímto slinným proteinem výrazně chrání myši před infekcí a zvyšuje protektivní účinky protilátek proti antigenům borrelií, např. proteinům OspA nebo OspC (Dai et al., 2009).

## 1.4 Vakcíny proti klíšťatům

První vakcína proti ektoparazitům byla vytvořena v Austrálii, následně také na Kubě, proti klíštěti *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* u hovězího dobytka. Na trh byla uvedena v roce 1994 pod názvem „TickGARD“ a „TickGARD“ plus (středoamerická verze pod názvem „Gavac“). Vakcína je založena na skrytém antigenu Bm86 ze stěvní stěny klíštěte *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*. (Willadsen et al., 1995; Willadsen, 1997). Dodnes je jedinou dostupnou vakcínou proti klíšťatům.

Vakcinace může být namířena proti složkám slin, které napomáhají přenosu patogenů a zvyšují nakažlivost. Také proti antigenům ze střeva nebo jiných tělních tkání vektora (Nuttall et al., 2006).

### 1.4.1 Exponované antigeny

Exponované antigeny jsou molekuly, které jsou přítomny ve slinném sekretu nebo v cementu klíštěte během sání, syntetizované ve slinných žlázách. Často se jedná o antihemostatické nebo imunosupresivní látky. Zachycují se v kůži hostitele, kde jsou vychytávány dendritickými Langerhansovými buňkami, které je prezentují imunitnímu systému. Je proti nim tedy namířena imunitní odpověď (Nuttall et al., 2006). Vyvolávají imunitu, která dokáže zabránit sání klíštěte a přenosu patogenů. Získaná imunita je zvyšována opakovaným sáním klíšťat (Mulenga et al., 1999). Konkrétní funkci těchto molekul je bohužel složité zjistit kvůli nepřehlednému množství těchto látek a malému množství slin z klíštěte (Jaworski et al., 1995).

### 1.4.2 Skryté antigeny

Skryté antigeny jsou schované před imunitními mechanismy hostitele, čili nestimulují imunitní odpověď hostitele při sání klíštěte. Získávají se z různých tělních tkání klíštěte, nejčastěji ze stěvní stěny, dále pak z vajíčkového žlutku nebo z tuku samiček. Měly by být

spojeny s některými důležitými fyziologickými funkcemi klíšťat (Nuttall et al., 2006). Jednou z nejdůležitějších fyziologických funkcí je trávení. Trávení klíšťat je specifické, protože nedochází k sekreci trávicích enzymů do lumen střeva, což usnadňuje vývoj patogenů ve střevě klíšťete. Střevo je tedy důležitým místem pro vývoj a přežívání patogenů a tvoří hlavní bariéru mezi klíšťetem a hostitelskými obrannými mechanismy (Agyei et Runham, 1995; Willadsen et Kemp, 1988).

Tyto antigeny vyvolávají imunitu, která snižuje schopnost přežívání a rozmnožování, ale nemá vliv na zamezení sání klíšťat (Mulenga et al., 1999). Krev hostitele imunizovaného těmito antigeny s sebou nese protilátky, komplement a buňky imunitního systému. Pokud parazit nasaje tuto krev, dojde k reakci protilátek s vnitřním antigenem, což vede k poškození klíšťete. Některá klíšťata hynou a ta která přežijí mají sníženou schopnost sání a reprodukce (McKenna et al., 2007, Willadsen et al., 1993). Nevýhodou takovéto imunizace je, že nedochází ke stimulaci imunitní odpovědi na tyto antigeny a není vyvolána imunitní paměť. Záleží především na množství vytvořených protilátek a imunizace musí být často opakována (Nuttall et al., 2006).

#### **1.4.3 Duální vakcíny (dual action vakcíny)**

Další strategií jsou duální vakcíny. Jedná se o identifikaci takových antigenů, které cílí jak sekretované, tak skryté antigenní epitopy. To znamená, že antigen použitelný pro tuto vakcínu by měl být přítomný jak ve slinném sekretu, tak ve fyziologicky důležité tkáni klíšťete (Nuttall et al., 2006, Labuda et al., 2006). Takové antigeny by stimulovaly specifickou protektivní imunitní odpověď hostitele a udržovaly by vysoký stupeň imunity, což by eliminovalo potřebu opakované vakcinace. Zároveň by docházelo k produkci protilátek, které by reagovaly se skrytými střevními antigeny (Trimnell et al. 2002).

#### **1.4.4 Přenos blokující vakcíny (trans-block vakcíny)**

Vakcinace molekulou, kterou patogen vyžaduje k přenosu, je další strategií pro vývoj vakcíny proti klíšťaty přenášeným mikrobům (Dai et al., 2009) Jedná se tzv. trans-block vakcínu. Taková vakcína by měla blokovat přenos patogena z vektora na hostitele. Jak již bylo zmíněno, ve slinách klíšťat jsou obsaženy faktory napomáhající přenosu, SAT faktory. Tyto vakcíny by byly založeny na těchto molekulách (Nuttall et al., 2006).

## 1.5 Cystatiny

Cystatiny fungují jako inhibitory cysteinových proteáz. Cysteinové protézy jsou proteolytické enzymy (př. katepsiny, kaspázy, papain) obsahující v aktivním centru aminokyseliny cystein a histidin. Jsou důležité v metabolismu a degradaci proteinů (Kotyza, Křepela, 2002).

Cystatiny mají ve své struktuře ~115 aminokyselin obsahujících čtyři cysteinové zbytky, které tvoří dva disulfidické můstky. Díky této cystatinové doméně mají schopnost inhibovat proteázy (Brown, Dziegielewska, 1997). Dělí se do tří rodin na základě aminokyselinových sekvencí (a dle počtu cystatinových domén):

1. *stefiny*- intracelulární, jedna doména bez disulfidických můstků (př. stefin B)

2. *cystatiny*- sekretované, v tělních tekutinách, jedna doména s dvěma disulfidickými můstky (př. cystatin C)

3. *kininogeny*- sekretované, v krevní plasmě, tři cysteinové domény s disulfidickými můstky (př. potkaní kininogen T) (Barrett et al., 1986; Vray et al., 2002).

K cystatinům někdy řadíme i čtvrtou skupinu- lidské *fetuiiny*, které ale nemají inhibiční schopnosti (Brown, Dziegielewska, 1997).

### 1.5.1 Cystatiny v organismech

Cystatin byl poprvé izolován z bílku slepičího vajíčka (Barrett et al., 1986). Byl důkladně prozkoumán a slouží jako modelová molekula cystatinů. Cystatiny jsou přítomné u obratlovců, bezobratlých, rostlin i protozoí a jsou zahrnuty v mnoha biologických procesech (Turk, Bode et al., 1991).

Cystatiny obsažené v rostlinách byly dobře charakterizovány např. u rýže nebo kukuřice. Podílejí se na metabolismu proteinových molekul během klíčení a zrání rostlin. Účastní se obranných procesů proti herbivornímu hmyzu a patogenům (Pernas et al., 1997).

Nejvýznamnějším lidským cystatinem je cystatin C, je přítomný i u potkanů a myší. Je sekretován mononukleárními fagocyty neboli makrofágy, účastní se fagocytózy (Vray et al., 2002). Je důležitým inhibitorem katepsinů (B, H, L a S). Koncentrace cystatinu C v extracelulární tekutině má klinický význam, například k odhadu glomerulární filtrace ledvin (Brguljan, Cimerman, 2007).

Cystatiny izolované z parazitických nematod, žijících v trávicím traktu nebo vnitřních tkáních hostitele, vykazují imunomodulační aktivitu. Potlačují proliferaci T-lymfocytů a inhibují zánětlivou reakci. Podporují produkci TNF $\alpha$ , IL-10 a také oxidu dusnatého (NO) aktivovanými makrofágy, který navíc také působí jako inhibitor cysteinových proteáz. Cystatiny mají vliv i na prezentaci antigenu dendritickými buňkami (Vray et al., 2002). Cystatiny mohou být vhodnými kandidáty na vytvoření vakcíny proti nemocem, které jsou způsobovány těmito nebezpečnými parazity. Pokusy byly provedeny např. s rekombinantním cystatinem ze střeva hlístice *Haemonchus contortus*, ale výsledky neukázali výraznou ochranu před tímto parazitem (Newlands et al., 2001). Vakcinační pokusy byly provedeny také s cystatinem z filárií *Litomosoides sigmodontis*. Nebyl pozorován vliv na mortalitu dospělých filárií, ale u vakcinovaných zvířat docházelo ke snížení množství mikrofilárií v krvi až o 50 % (Pfaff et al., 2002).

### 1.5.2 Cystatiny v klíšťatech

Geny kódující inhibitory cysteinových proteáz byly nalezeny u několika druhů klíšťat. Cystatiny jsou přítomné především ve slinných žlázách, ale také ve střevní stěně klíšťat, hemocytech a dalších tělních tkáních. Jedná se především o inhibitory papainu a katepsinu L, což je významná trávicí cysteinová proteáza klíšťat. Zkoumány jsou hlavně jejich imunomodulační vlastnosti (Zhou et al., 2006).

Prvním popsáním cystatinem u klíšťat byl cystatin z klíšťete *Amblyomma americanum*, je to molekula přítomná jak ve slinných žlázách, tak ve střevě, což svědčí o různých funkcích tohoto cystatinu. Bylo prokázáno, že jeho přítomnost ve slinách ovlivňuje zpracování a prezentaci antigenu buňkami imunitního systému hostitele (Karim et al., 2005).

Příkladem cystatinu přítomného pouze ve střevní stěně a hemocytech je Hlcyst-2 a Hlcyst-1 z klíšťete *Haemaphysalis longicornis*. Ve slinných žlázách naopak přítomný není, a proto nemá vliv na sání krve a neovlivňuje imunitní odpověď hostitele. Podílí se na metabolismu proteinů z přijaté krve (Zhou et al., 2006). Dalším cystatinem izolovaným z tohoto klíšťete je HISC-1. Ten je přítomný ve slinách a hraje důležitou roli při sání klíšťete (Yamaji et al., 2009).

Z klíšťete *Ornithodoros moubata* byly izolovány dva cystatiny- OmC 1 a OmC 2. Zatímco OmC1 je přítomný hlavně ve střevě klíšťete, OmC2 byl nalezen i v jiných tkáních, mimo jiné je také sekretovaný slinnými žlázami klíšťete (Grunclová et al., 2006). OmC2 má supresivní účinky na imunitu hostitele. Potlačuje produkci zánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$  a IL-12) a proliferaci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (Salát et al., 2010).

Jedním z cystatinů identifikovaným ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* je Sialostatin L. Potlačuje proliferaci cytotoxických T-lymfocytů a byly také prokázány jeho protizánětlivé účinky (Kotsyfakis et al., 2006). Sialostatin L2, další podobný cystatin tohoto klíštěte, také vykazuje imunomodulační účinky. Oba tyto cystatiny inhibují katepsin L a S, klíčové enzymy v imunitě obratlovců (Kotsyfakis et al., 2008). Sialostatin L2 je druhým popsáním SAT faktorem pro borelie (Kotsyfakis et al., 2010).

### **1.5.3 Cystatin klíštěte *Ixodes ricinus***

Cystatin z klíštěte *Ixodes ricinus* je protein o molekulové hmotnosti 15,9 kDa. Je schopen inhibovat funkci papainu. Pojmenovaný je cystatin 3. K produkci mRNA pro cystatin dochází ve střevě i slinných žlázách, dále pak v malpighiho trubicích, trachejích a vaječnicích klíštěte *Ixodes ricinus*. Transkripční aktivita ve střevě začíná už první den sání, ve slinných žlázách až poslední den sání (přibližně čtvrtý den u nymf a sedmý den u dospělců) (Perner, 2008).

Jeho vakcinačním potenciálem se bude zabývat tato práce.

## 2. Cíle práce

1. Produkce rekombinantního cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus* v bakulovirovém expresním systému.

2. Testování vakcinačního potenciálu připraveného cystatinu pomocí imunizačních pokusů v modelovém systému: laboratorní myš - klíště *Ixodes ricinus*.



### **3. Materiál a metody**

#### **3.1 Laboratorní zvířata**

##### **3.1.1 Myši**

V pokusech byly použity samice inbredních myší kmen C3H/HeN (AnLab s.r.o.) ve stáří 8 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

##### **3.1.2 Klíšťata**

Pro pokusy byly použity nymfy a dospělci klíštěte *Ixodes ricinus* z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

#### **3.2 Expresa a purifikace proteinu**

##### **3.2.1 Rekombinantní bakulovirus s genem pro cystatin**

Rekombinantní bakulovirus použitý k produkci cystatinu *Ixodes ricinus* (CIR) byl již dříve připraven na oddělení Imunologie parazitóz Parazitologického ústavu AV ČR. Amplifikované úseky CIR (cystatin *Ixodes ricinus*) cDNA (GenBank® AJ547803.1) byly zaklonovány do vektoru pBacPAK9.

Primery byly navrženy tak, aby zahrnovaly signální sekvenci pro export z buňky a došlo k přidání oligohistidinového konce (-Gly-His<sub>6</sub>), důležitého při následném čištění proteinu. Pro zaklonování do vektoru byla použita restriční místa NotI a BamHI. Konstrukt byl amplifikován v XL1-Blue cells (Stratagene). Bakulovirus obsahující gen pro CIR byl připraven homologní rekombinací mezi *flashBAC* a vektorem DNA podle instrukcí v návodu (Salát et al., 2010).



### 3.2.3 Expres a purifikace cystatinu *Ixodes ricinus*

Pro expresi byly použity také hmyzí buňky Sf9 v růstové fázi pěstované v médiu Sf-900 II SFM (Gibco) s obsahem ATB (1 % Penicilin-streptomycin (Gibco), 1 % Kanamycin sulfát (Gibco)). Ke 400 ml buněk Sf9 o koncentraci  $10^6$ /ml bylo přidáno 20 ml zásobního viru. Následně byly 76 hodin inkubovány při 28 °C. Došlo k replikaci viru v buňkách a produkci CIR. Opět se stejným způsobem změnila morfologie infikovaných buněk. Kultura byla centrifugována při 2860 g/ 30 minut při 20 °C. K peletu byla přidána 0,5 M kyselina citrónová až do pH kolem 5,5 (optimální pH pro purifikaci proteinů značených histagem na heparinové koloně). Takto byl roztok ponechán přes noc při 4 °C z důvodu srážení solí.

Medium bylo opět centrifugováno 2860 g/30 minut při 20 °C, přefiltrováno za použití filtru Stericup<sup>®</sup> Filter 0,22 µm (Millipore) a poté aplikováno na heparinovou kolonu HiTrap<sup>™</sup> Heparin (GE Healthcare). Došlo k zachycení proteinu pomocí histagu na kolonu. K uvolnění proteinu z kolony bylo použito 13 ml 2M roztoku NaCl.

Roztok s proteinem byl smíchan s vazebným médiem (100 ml 0,2 M fosfátového pufru, 50 ml 3 M NaCl, 50 ml glycerolu, 300 ml H<sub>2</sub>O, pH 8) a aplikován na kolonu s Co<sup>2+</sup> částicemi TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech). Z kolony byl protein uvolněn 250 mM roztokem imidazolu.

Posledním krokem purifikace CIR byla gelová filtrace (chromatografie), separace proteinů podle velikosti molekuly. Vzorek prochází kolonou s polymerním gelem, molekuly jsou na základě své velikosti zadržovány v koloně, první z kolony vycházejí největší proteiny. Kolona Superdex<sup>™</sup> 75 (GE Healthcare) byla ekvilibrována puftrem (15 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,2). Průběh purifikace byl monitorován spektrofotometricky při vlnové délce  $\gamma = 212$  nm. Vybrané frakce byly analyzovány na polyakrylamidovém gelu.

### 3.2.4 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza)

Slouží k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Elektroforéza probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli ( $U = 200$  V) v elektroforetickém puftu (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS). Ke 13 µl vzorku bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru NuPAGE<sup>®</sup> (Invitrogen) a 2 µl redukčního činidla NuPAGE<sup>®</sup> (Invitrogen). Poté byly vzorky denaturovány 10 min při 70 °C. Vzorky byly naneseny na gradientový polyakrylamidový gel (5-17 %, Invitrogen). Jako marker byl použit SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Po doběhnutí vlastní elektroforézy byl gel barven přibližně hodinu v Coomasi Brilliant Blue (Merck), poté byl přes noc uložen na třepačce v odbarvovacím roztoku (10 % CH<sub>3</sub>COOH, 25 % CH<sub>3</sub>OH) a následně analyzován.

### 3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů: Metoda podle Bradfordové

Spektrofotometrická metoda sloužící ke stanovení koncentrace proteinu v roztoku pomocí absorbance. Byla použita kalibrační řada albuminu (o známých koncentracích 50 - 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Do mikrotitrační destičky bylo nanášeno vždy po 5  $\mu\text{l}$  vzorku kalibrační řady a vzorku proteinu, poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla. Spektrofotometrem Multiskan MCC 340 (Labsystems Oy) byla změřena absorbance při vlnové délce  $\gamma = 595 \text{ nm}$  a z naměřených hodnot byla odečtena koncentrace přečištěného proteinu.

## 3.3 Imunizační pokusy

### 3.3.1 Příprava vakcíny a imunizace myší

Očkovací látkou byl purifikovaný cystatin z klíštěte *Ixodes ricinus*, jako kontrola byl k imunizaci použit ovalbumin. 20  $\mu\text{g}$  proteinu bylo smícháno s 50  $\mu\text{l}$  Freudova adjuvans (1. dávka- kompletní adjuvans s tuberkulózními bakteriemi, 2. a 3. dávka nekompletní adjuvans) do finálního objemu 100  $\mu\text{l}$  PBS. Směs byla následně promíchávána až do vzniku bílé emulze.

Myším byla intraperitoneálně injikována vakcína obsahující CIR nebo ovalbumin. Imunizace byla opakována celkem třikrát po 10-14 denních intervalech.

### 3.3.2 Schéma vakcinačních pokusů

#### *1. pokus - základní imunizační pokus*

K základním vakcinačním pokusům bylo použito 10 samic myší C3H/HeN. Třem myším byl injikován CIR, třem myším směs obsahující ovalbumin a čtyři myši byly ponechány jako negativní kontrola. 14 dní po poslední imunizaci byla všem myším odebrána krev z ocasu a bylo připraveno sérum.

Přibližně 14 dní po aplikaci třetí imunizační dávky byly na 9 myši (na čtvrté neimunizované myši klíšťata nesála) nasazeny nymfy klíštěte *Ixodes ricinus*. Klíšťata byla umístěna do speciálních komůrek připevněných na hřbet myši v počtu 12 klíšťat na jednu myš. Zde byla ponechána 72 hodin, kdy byl proveden první sběr nasátých klíšťat. Další sběry byly provedeny po 96 a 120 hodinách. Klíšťata byla následně spočítána (počet nasátých a počet neschopných dokončit sání) a zvážena. Poté byla přibližně měsíc ponechána při standardních podmínkách a byl sledován počet klíšťat, která se úspěšně vyvinula do stadia dospělce.

Měsíc po prvním sání byla myším opět odebrána krev z ocasu a následně na nich znovu sála klíšťata dle stejného časového schématu. Po posledním sběru klíšťat byla myším odebrána krev v narkóze a následně byly myši usmrceny. Ze všech odebraných kreví byla připravena séra a metodou ELISA byla zjišťována přítomnost protilátek.

## ***2. pokus - vliv sání klíšťat na obsah protilátek***

V rámci dalšího pokusu, který měl za úkol zjistit, zda sání klíšťat na imunizovaných myších ovlivňuje obsah protilátek proti CIR v krvi, bylo použito 6 samic myší C3H/HeN. Všechny tyto myši byly imunizovány CIR podle stejného časového schématu jako v základním pokusu a také jim byla po poslední vakcinaci odebrána krev.

V tomto pokusu klíšťata sála pouze na třech ze šesti myší. Další tři myši měly nasazeny pouze prázdné komůrky. Poté jim byla vždy po 14 dnech odebrána krev (2 odběry). Po měsíci na nich sála klíšťata znovu a po 14 dnech byla odebrána krev (3 odběry), kdy při posledním odběru byla krev odebrána v narkóze a myši byly poté usmrceny. Ze všech odebraných kreví byla připravena séra. Z těchto sér ředěných 1:10000 byl zjišťován obsah protilátek metodou ELISA.

### **3.3.3 ELISA**

Získaná séra byla použita k detekci protilátek proti cystatinu. Na mikrotitrační destičku byl navázán cystatin ve vazebném roztoku (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> v 1 litru H<sub>2</sub>O, pH 9,6) o koncentraci 10 µg/ml, inkubace probíhala ve vlhké komůrce 24 hodin při 4 °C. Poté byly vyblokovány nespecifické vazby blokovacím pufrem (10 % PTS v PBS) ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C. Po promytí byla na panel přidána naředěná myší séra (1:100, 1:1000, 1:10000 a následně ředěná dvojkovou řadou až do 1:640 000). Po inkubaci 30 minut při 37 °C byl destička opět promyta a byla přidána antimyší protilátka značená peroxidázou (Sigma) po 100 µl do každé jamky ředěná 1:1000 v ředícím roztoku (2 % PTS v PBS). Následovala další inkubace za stejných podmínek a promytí. Posledním krokem bylo přidání substrátového roztoku po 100 µl (10 ml fosfocitrátového pufru pH 5, 4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 mg OPD). Byla vyvolána barevná enzymatická reakce, která byla přibližně po 10 minutách zastavena 2M kyselinou sírovou. Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy) při vlnové délce 490 nm a byl zjištěn titr protilátek. Titr protilátek byl definován jako obrácená hodnota maximálního ředění, kde absorbance pozitivního vzorku ještě dosahovala dvojnásobné hodnoty absorbance vzorku negativní kontroly.

### 3.3.4 Odběr slin klíštěte *Ixodes ricinus*

K této metodě byly použity nasáté dospělé samice klíštěte *Ixodes ricinus*, sání probíhalo na morčeti po dobu šesti dní. Klíšťata byla omyta v ethanolu a ve vodě. Poté byla pomocí oboustranné lepicí pásky přichycena na podložní sklíčko. Pod stereomikroskopem jim byla na hypostom nasazena skleněná kapilára, na hřbetní část klíšťat nanoseny 2  $\mu$ l roztoku pilocarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) o koncentraci 5  $\mu$ g/ml v 70 % ethanolu. Takto připravená klíšťata byla umístěna ve vlhké komůrce při 37 °C. Průběžně u nich byla kontrolována produkce slin, které byly následně odebírány z kapiláry. U získaných slin byl změřen objem a koncentrace proteinu (pomocí metody podle Bradfordové) a byly uskladněny při -80 °C.

#### 3. pokus - vliv imunizace CIR na rozpoznatelnost dalších proteinů ve slinách

Sliny byly použity v pokusu, který měl za úkol zjistit, zda imunizace myší CIR bude zvyšovat rozpoznatelnost ostatních proteinů obsažených ve slinách. Byla provedena ELISA, kdy byly na mikrotitrační destičku navázány sliny o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. K pokusu byla použita séra myší na kterých dvakrát sála klíšťata ředěná 1:100.

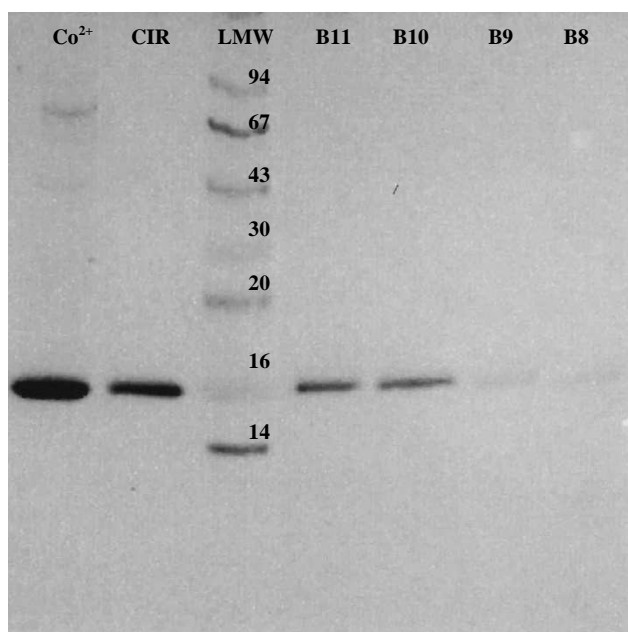
### 3.3.5 Vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program GraphPad Prism 5. Pro vyhodnocení průměrů hmotností nasátých klíšťat byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA). K vyhodnocení počtu nasátých klíšťat a počtu klíšťat přeměněných do dalšího stadia byl použit  $\chi^2$  test. K vyhodnocení průměrných hodnot absorbance u 2. pokusu byl použit t-test. K vyhodnocení průměrných hodnot absorbance u 3. pokusu byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA) doplněná o Tukeyho test. Za signifikantní byly považovány výsledky, jejichž hladina významnosti p byla nižší než 5 %.

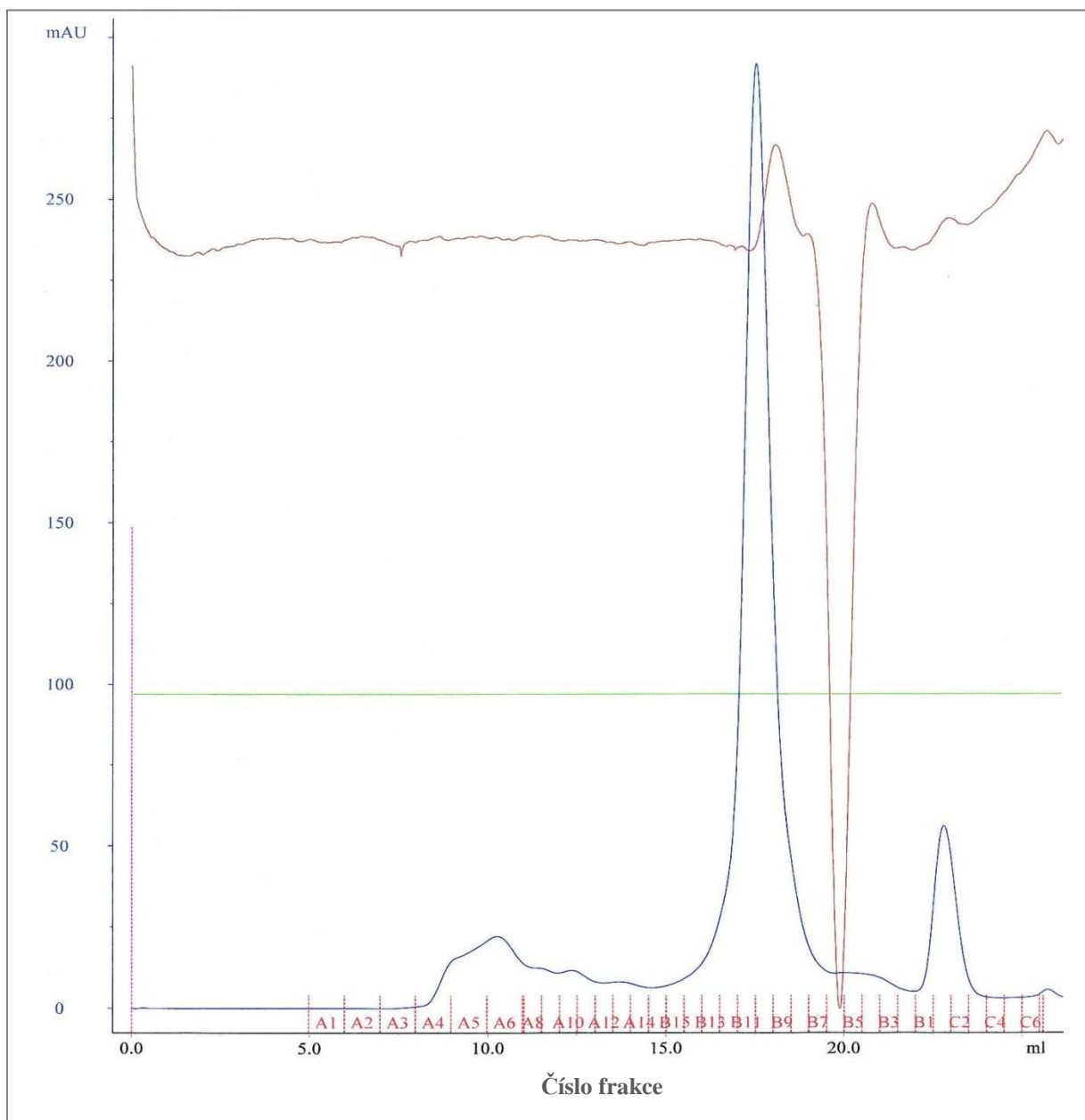
## 4. Výsledky

### 4.1 Purifikace proteinu

Purifikace proteinu probíhala v několika krocích. Nejprve byl protein v médiu aplikován na heparinovou kolonu, poté na kolonu s  $\text{Co}^{2+}$  částicemi. Posledním krokem byla gelová filtrace (chromatografie), jejíž průběh byl spektrofotometricky monitorován při vlnové délce  $\gamma = 212 \text{ nm}$  (**Obr. 2**). Podle hodnot absorbance byly následně sebrány frakce odpovídající cystatinu (B13, B12, B11, B10, B9, B8, B7), pro ověření byly některé aplikovány na SDS-PAGE (**Obr. 1**). Přečištěný protein byl poté zkoncentrován.



**Obr. 1: Purifikace CIR, vybrané frakce z gelové filtrace.** LMW- molekulový marker [kDa].  $\text{Co}^{2+}$  - protein přečištěný na kobaltové koloně, tento vzorek byl aplikován na gelovou filtraci. CIR - purifikovaný protein z gelové filtrace (zkoncentrované frakce). B11, B10, B9, B8- vybrané frakce z gelové filtrace odpovídající CIR.

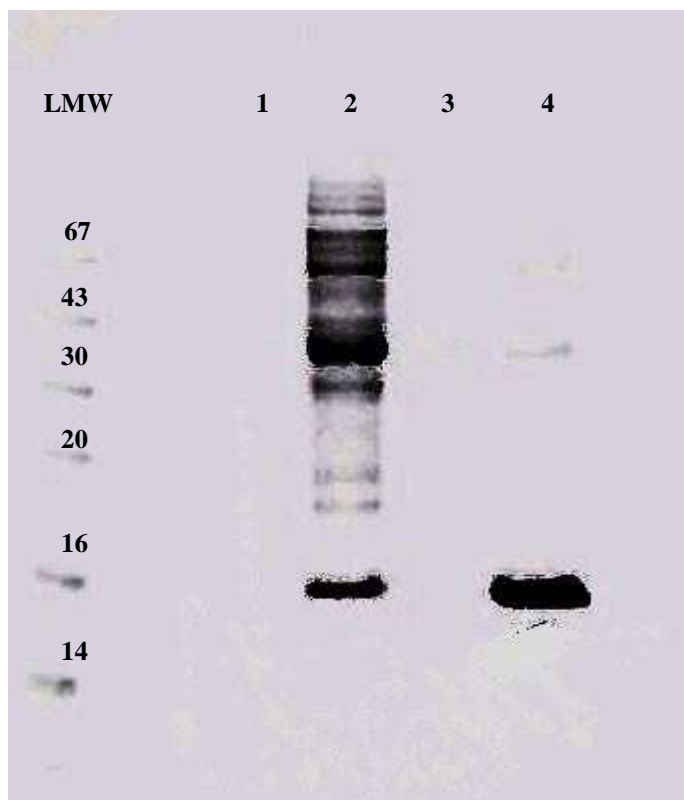


**Obr. 2: Průběh gelové chromatografie.** Jednotlivé křivky označují- **absorbanci**, **tlak** a **vodivost**. Graf ukazuje hodnoty absorbance při vlnové délce 212 nm v závislosti na koncentraci proteinu v dané frakci. Cysatinu odpovídají frakce B13-B7.

Výtěžek ze 400 ml buněčné kultury nakažené bakulovirem byl přibližně 750 $\mu$ g/ml proteinu. Takto purifikovaný protein byl uložen při teplotě -20 $^{\circ}$ C a následně použit na imunizaci.

Z každého kroku čištění byl vždy odebrán vzorek, který byl aplikován na SDS-PAGE (**Obr. 3**).





**Obr. 3: Purifikace CIR.** Vzorčky odebrané z jednotlivých kroků purifikace. 1 - heparinová kolona- „flow through“; 2 - uvolněný protein z heparinové kolony; 3 - kobaltová kolona- „flow through“; 4 - protein uvolněný z kobaltové kolony.

## 4.2 Imunizační pokusy

Základní vakcinační pokus byl opakován celkem třikrát. Pro přehlednost při interpretaci výsledků je schéma pokusů uvedeno v **Tab. 1**.

**Tab. 1: Schéma imunizačních pokusů.** Skupina K (kontrola) zahrnovala vždy 4 myši, z nichž jedna myš byla ponechána jako celkově negativní kontrola, tzn. byla neimunizovaná a nesála na ní klíšťa.

Myši	Imunizace	Dávka	Sání klíšťa
C (3 myši)	cystatin	3 x 20 $\mu$ g	2 sání
O (3 myši)	ovlabumin	3 x 20 $\mu$ g	2 sání
K (3 myši)	bez imunizace		2 sání

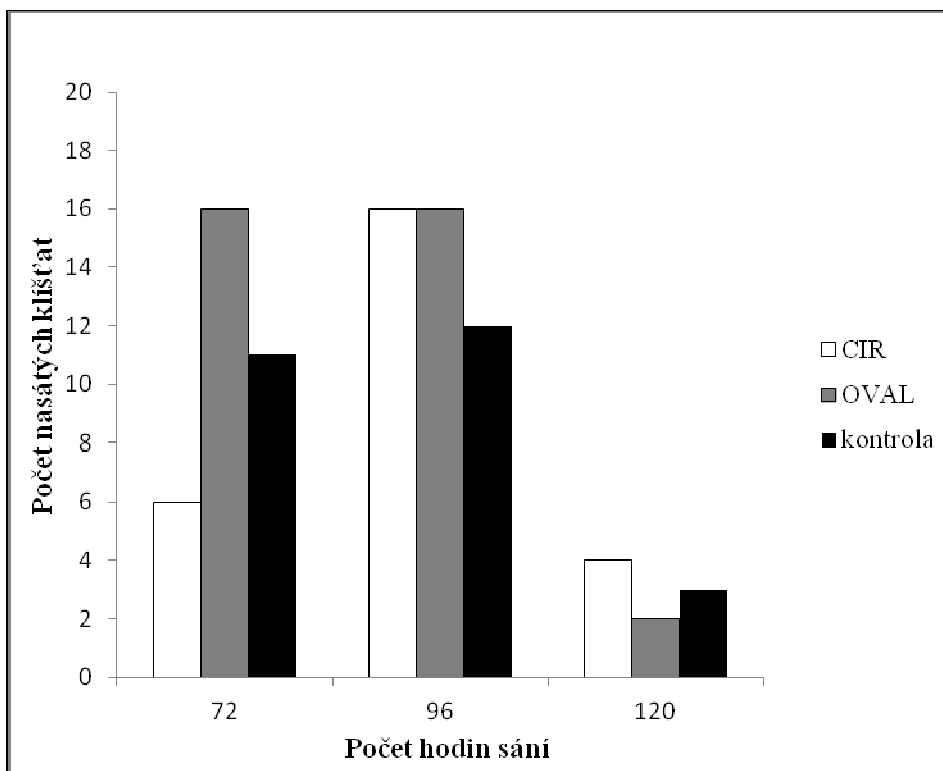
#### 4.2.1 Souhrnné výsledky základních imunizačních pokusů

Po podání všech tří dávek byl myším změřen titer protilátek. Následně byly na myši dvakrát nasazeny nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* (druhé sání probíhalo přibližně 30 dní po prvním). Vyhodnocován byl počet nasátých klíšťat po 72, 96 a 120 hodinách, hmotnost nasátých klíšťat, počet klíšťat, která nedokončila sání a počet klíšťat, která byla schopna přeměny do dalšího stadia (stadia dospělce) (**Tab. 2**).

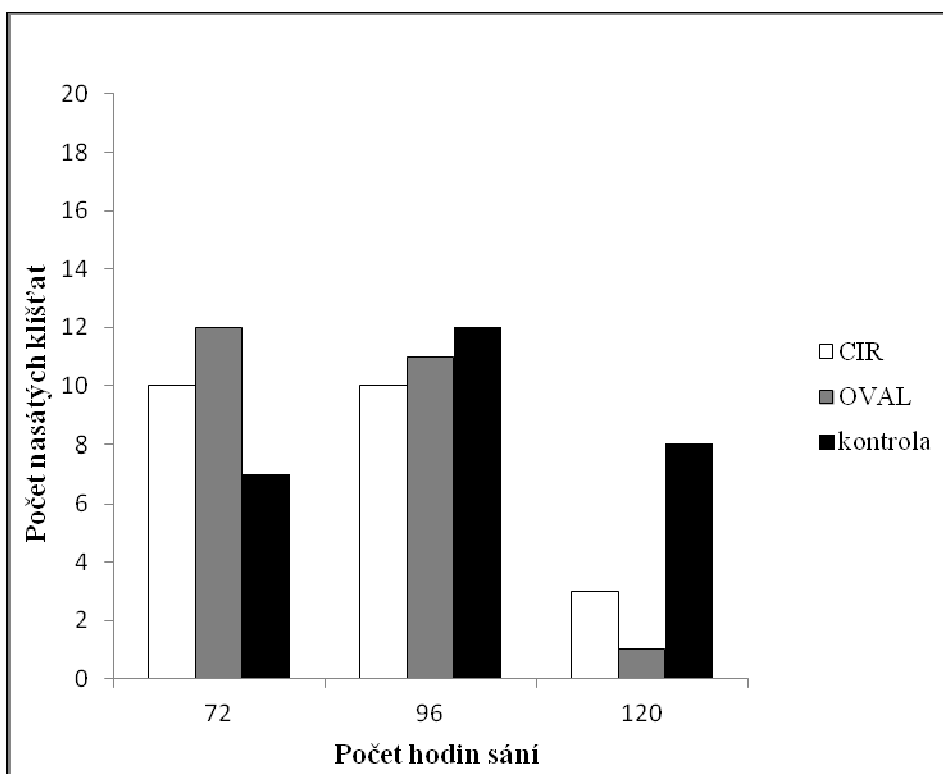
**Tab. 2:** Výsledky sání klíšťat na myších

Myši	Počet klíšťat celkem	Nedosátá klíšťata	Prům. hmotnost nasátých kl. ± SEM	Počet kl. přeměněných do stadia dospělce
<b>1. sání</b>				
Cystatin	36	10 z 36 (28 %)	3,852 ± 0,2274	25 z 26 (96 %)
Ovalbumin	36	2 z 36 (5,5 %)	4,059 ± 0,2209	29 z 34 (85 %)
Kontrola	36	10 z 36 (28 %)	3,815 ± 0,2299	26 z 26 (100 %)
<b>2. sání</b>				
Cystatin	36	13 z 36 (36 %)	4,009 ± 0,2196	22 z 23 (96 %)
Ovalbumin	36	12 z 36 (33 %)	3,750 ± 0,2553	22 z 24 (92 %)
Kontrola	36	9 z 36 (25 %)	3,767 ± 0,1777	27 z 27 (100 %)

Grafy (**Obr. 4** a **Obr. 5**) ukazují počet nasátých klíšťat během daných časových intervalů při prvním a druhém sání. Všechny tři provedené pokusy vykazovaly obdobné výsledky. Z prvního grafu (první sání) (**Obr. 4**) lze vyčíst, že klíšťata sající na myších imunizovaných cystatinem sála pomaleji a nejvíce nasátých klíšťat se objevilo až po 96 hodinách. Během druhého sání se ale tento jev neopakoval.



Obr. 4: Počet nasátých klíšťat během prvního sání u jednotlivých skupin myší v závislosti na čase.

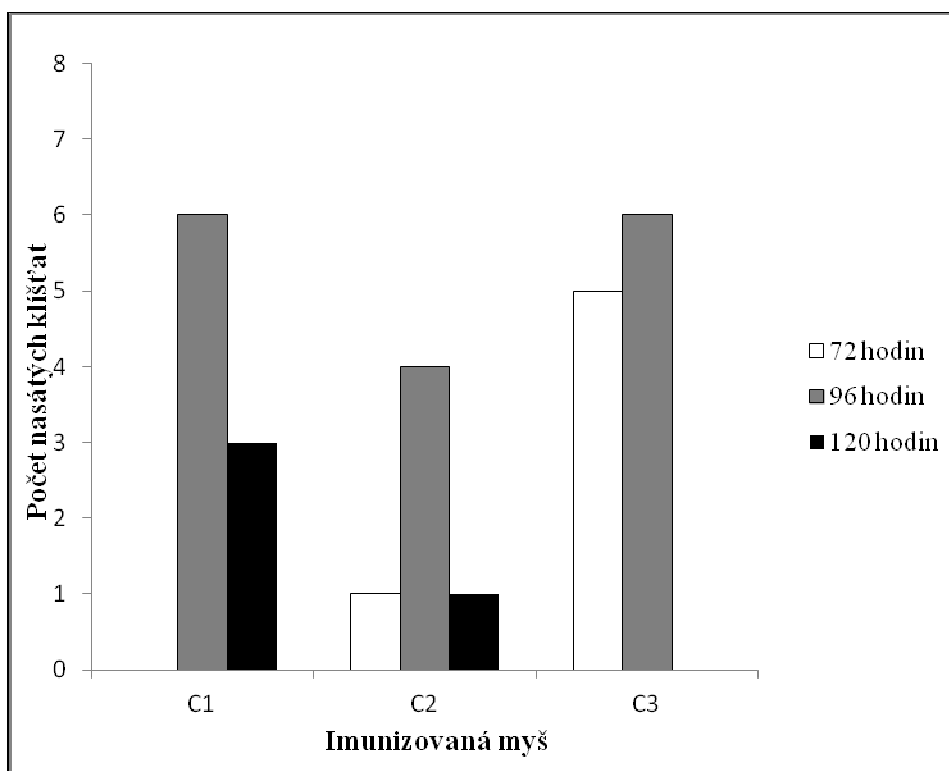


Obr. 5: Počet nasátých klíšťat během druhého sání u jednotlivých skupin myší v závislosti na čase.

Úspěšnost sání klíšťat na myších imunizovaných cystatinem může záviset na titru protilátek proti cystatinu. Z **Obr. 6** je patrné, že vyšší titr protilátek proti cystatinu může ovlivňovat délku sání klíšťat. U myši C1 byl naměřen nejvyšší titr protilátek (**Tab. 3**) a klíšťata sála na této myši pomaleji, nasátá klíšťata se u této myši objevila až po 96 hodinách. Oproti tomu u myši C3 s nejmenším titrem se velký počet nasátých klíšťat objevil už po 72 hodinách.

**Tab. 2: Titr protilátek proti cystatinu u imunizovaných myší**

Myš	Titr (1. sání)
C1	1:320 000
C2	1:160 000
C3	1:40 000



**Obr. 6: Délka sání klíšťat na myších imunizovaných cystatinem.**

## 4.2.2 Statistické vyhodnocení účinnosti vakcinace

### Hmotnost

Průměrné hmotnosti nasátých klíšťat byly statisticky vyhodnoceny jednocestnou analýzou variance (ANOVA), při 95 % hladině významnosti. Výsledky ukazují porovnání variability mezi skupinami. Z **Tab. 4** je patrné, že průměry hmotností klíšťat, která sála na jednotlivých skupinách myši se od sebe navzájem neliší.

**Tab. 4: Statistické vyhodnocení hmotností nasátých klíšťat**

Skupiny myši	F (hodnota testovacího kritéria)	df (stupně volnosti)	p (hladina významnosti)	SS (suma čtvců)	MS (suma čtvců/df)
<b>1. sání</b>					
CIR vs. OVAL vs. kontrola	0,3599	2	0,6989	1,054	0,5272
<b>2. sání</b>					
CIR vs. OVAL vs. kontrola	0,4272	2	0,6540	0,9932	0,4966

### Počet klíšťat, která dokončila sání

Počet nasátých klíšťat byl statisticky vyhodnocen  $\chi^2$  testem. Porovnáván byl počet klíšťat, která sála na myších imunizovaných cystatinem, se skupinou klíšťat sajících na myších vakcinovaných ovalbuminem a kontrolních myších (**Tab. 5**). Z tabulky je patrné, že u skupin cystatinu a ovalbuminu po prvním sání došlo k signifikantnímu rozdílu v počtu klíšťat, která byla schopna dokončit sání. Počet nasátých klíšťat u kontrolní skupiny byl stejný jako u skupiny vakcinované cystatinem, proto byl signifikantní rozdíl i mezi kontrolní skupinou a skupinou vakcinovanou kontrolním proteinem. V porovnání cystatinu s kontrolní skupinou nebyly zjištěny signifikantní rozdíly, proto nejsou výsledky statisticky významné.

**Tab. 5: Statistické vyhodnocení počtu klíšťat, která dokončila sání** (df- stupeň volnosti = 1). Červeně jsou označeny výsledky, které byly vyhodnoceny jako signifikantní.

Skupiny myši	$\chi^2$ test	p (hladina významnosti)
<b>1. sání</b>		
CIR vs. OVAL	6,400	0,0057
CIR vs. kontrola	0	0,5
OVAL vs. kontrola	6,400	0,0057

<b>2. sání</b>		
CIR vs. OVAL	0,0612	0,4022
CIR vs. kontrola	1,0470	0,1531
OVAL vs. kontrola	0,6050	0,2183

#### *Počet klíšťat, která se přeměnila do dalšího stadia*

Počet klíšťat přeměněných do dalšího stadia byl statisticky vyhodnocen také  $\chi^2$  testem. Opět byly porovnávány všechny skupiny se všemi (**Tab. 6**). Z tabulky lze vyčíst, že signifikantní rozdíl mezi počtem klíšťat schopných přeměny do dalšího stadia byl pozorovaný mezi skupinou vakcinovanou ovalbuminem a kontrolní skupinou. Skupina imunizovaná cystatinem se od ostatních dvou skupin nelišila.

**Tab. 6: Statistické vyhodnocení počtu klíšťat, která se přeměnila do dalšího stadia** (df - stupeň volnosti = 1)

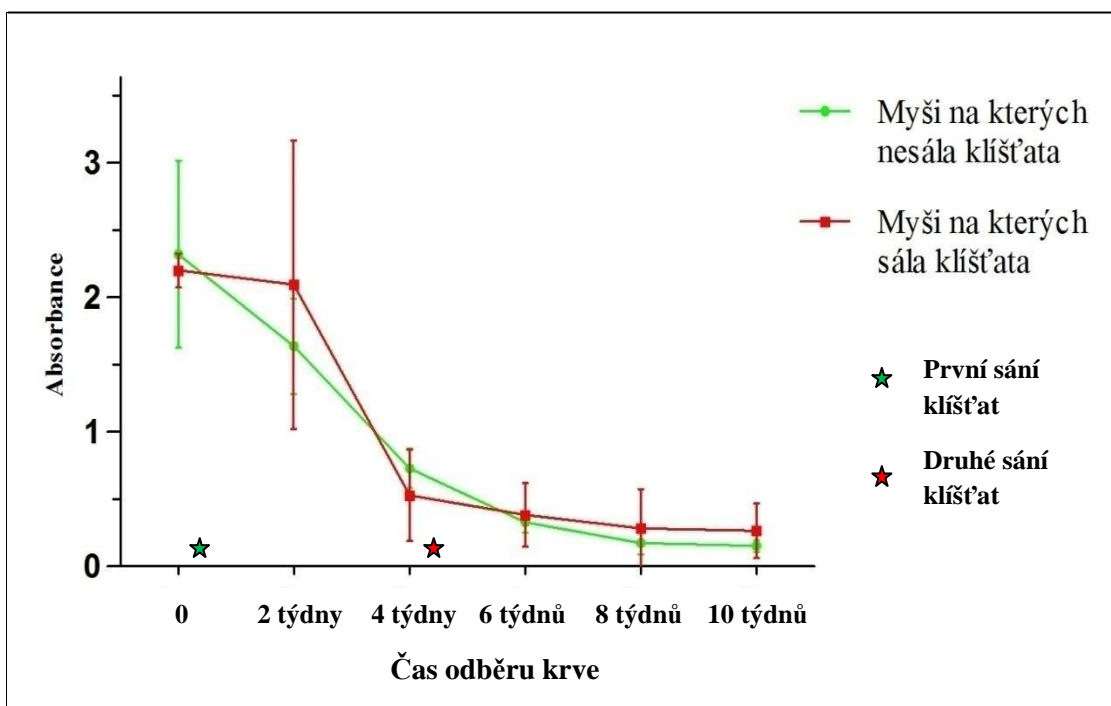
Skupiny myší	$\chi^2$ test	p (hladina významnosti)
<b>1. sání</b>		
CIR vs. OVAL	1,9310	0,0823
CIR vs. kontrola	1,0200	0,1563
OVAL vs. kontrola	<b>4,171</b>	<b>0,0206</b>
<b>2. sání</b>		
CIR vs. OVAL	0,3122	0,2882
CIR vs. kontrola	1,1980	0,1369
OVAL vs. kontrola	2,342	0,0630

#### **4.2.3 Vyhodnocení vlivu sání klíšťat na množství protilátek**

Na třech ze šesti myší imunizovaných cystatinem sála dvakrát klíšťata. Všem myším byla šestkrát odebrána krev: 1. odběr - před sáním klíšťat

2. odběr - 2 týdny po prvním sání
3. odběr - 4 týdny po prvním sání
4. odběr - 2 týdny po druhém sání
5. odběr - 4 týdny po druhém sání
6. odběr - 6 týdnů po druhém sání

Z krve byla připravena séra a z nich byl zjišťován obsah protilátek metodou ELISA, při ředění sér 1:10000. Graf (**Obr. 7**) ukazuje hodnoty absorbance ( $\gamma = 490 \text{ nm}$ ) jednotlivých odběrů u obou skupin myší. Z obrázku je patrné, že hodnoty postupně klesaly u obou skupin, největší pokles byl zaznamenán u druhého odběru po prvním sání. U myší na kterých klíšťata sála došlo dokonce k většímu poklesu.



**Obr. 7: Obsah protilátek proti cystatinu u dvou skupin myší.** Každá hodnota absorbance je průměr se směrodatnou odchylkou určený z měření třech myší v každé skupině.

Výsledky jednotlivých odběrů, kromě prvního odběru před sáním klíšťat, byly statisticky vyhodnoceny t-testem při 95 % hladině významnosti. Z výsledků vyplývá (**Tab. 7**), že nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi množstvím protilátek mezi skupinami myší ani v jednom odběru. U myší na kterých sála klíšťata tedy nedošlo k výraznému zvýšení obsahu protilátek. V jednom z měření (3. odběr krve) byla hodnota dokonce nižší než u skupiny, na které klíšťata nesála.

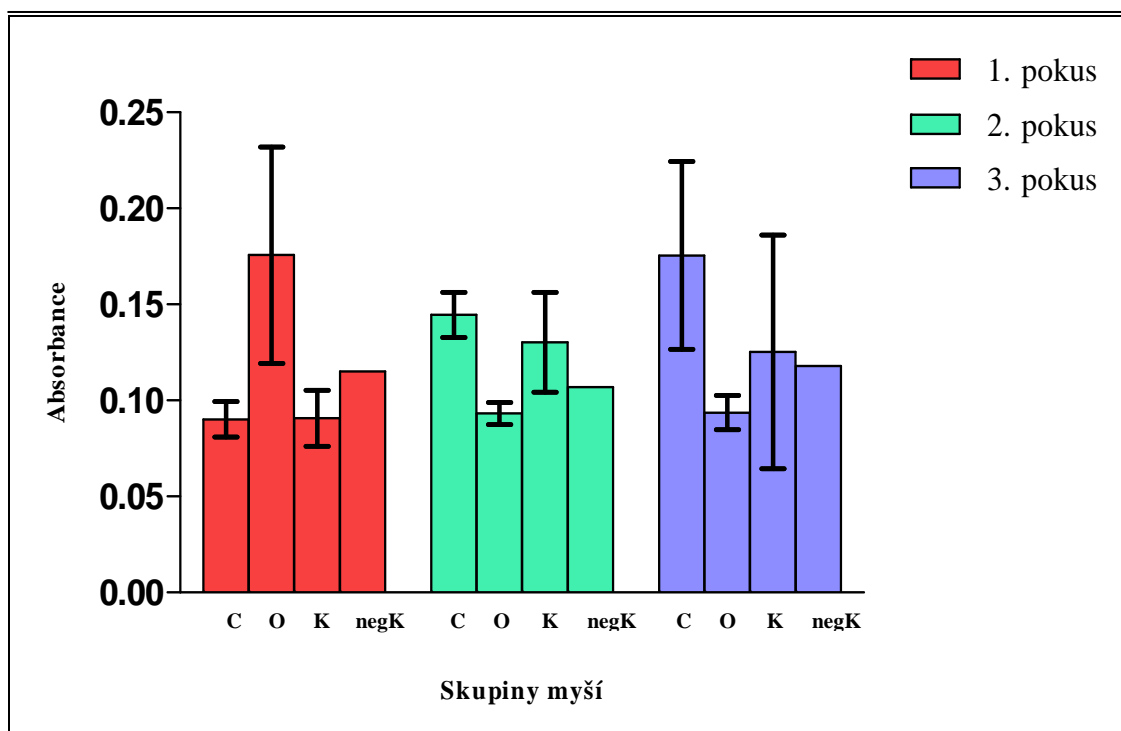
**Tab. 7: Statistické vyhodnocení obsahu protilátek proti cystatinu u dvou skupin myši. 1. skupina je skupina, na které nesála klíšťata. Na 2. skupině klíšťata sála.**

Odběr krve	Skupina myši	Průměrné hodnoty absorbance $\pm$ SEM	t (hodnota testovacího kritéria)	df (stupně volnosti)	p (hladina významnosti)
<b>2.</b>	1. skupina	1,801 $\pm$ 0,2254	0,7020	4	0,2707
	2. skupina	2,305 $\pm$ 0,6812			
<b>3.</b>	1. skupina	0,8033 $\pm$ 0,0942	0,9426	4	0,1996
	2. skupina	0,5813 $\pm$ 0,2158			
<b>4.</b>	1. skupina	0,3610 $\pm$ 0,0503	0,3890	4	0,3585
	2. skupina	0,4227 $\pm$ 0,1503			
<b>5.</b>	1. skupina	0,1903 $\pm$ 0,0529	0,6353	4	0,2799
	2. skupina	0,3123 $\pm$ 0,1846			
<b>6.</b>	1. skupina	0,1677 $\pm$ 0,0282	0,9412	4	0,1999
	2. skupina	0,2923 $\pm$ 0,1294			

#### 4.2.4 Vyhodnocení vlivu imunizace cystatinem na rozpoznatelnost dalších proteinů ve slinách

K pokusu, který měl ukázat vliv imunizace cystatinem na rozpoznatelnost dalších proteinů obsažených ve slinách klíštěte, byla použita séra získaná ze všech tří opakovaných základních imunizačních pokusů po druhém sání klíšťat na myších. Tato séra byla zředěna 1:100 a byl zjišťován obsah protilátek proti slinám klíštěte metodou ELISA. Každý vzorek, kromě negativní kontroly, byl na mikrotitrační destičku nanesen v duplikaci. Graf (**Obr. 8**) ukazuje průměrné hodnoty absorbance se směrodatnými odchylkami u všech skupin myši v každém pokusu. Jako negativní kontrola byla použita myš, která nebyla ani imunizována, ani na ní nesála klíšťata.





**Obr. 8: Množství protilátek proti slinám klíštěte.** Hodnoty absorbance jsou průměrem hodnot všech myší ve skupině, kromě hodnot negativní kontroly, v této skupině byla zahrnuta pouze jedna myš.

Výsledky ze všech tří pokusů byly statisticky vyhodnoceny pomocí analýzy variance (ANOVA) při 95 % hladině významnosti. Všechny skupiny byly porovnány se všemi, kromě negativní kontroly, kde se nejednalo o průměrnou hodnotu. Z tabulky výsledků (**Tab. 8**) je patrné, že signifikantní rozdíly mezi obsahem protilátek proti slinám mezi skupinami byly zaznamenány u všech tří pokusů. Proto byl proveden ještě Tukeyho test, podle kterého bylo zjištěno, že ve všech pokusech došlo k signifikantním rozdílům u skupiny vakcinované kontrolním proteinem oproti kontrole i oproti skupině vakcinované cystatinem. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou vakcinovanou cystatinem naměřeny nebyly. V prvním pokusu byl zaznamenán opačný výsledek, než jaký byl očekáván. Hodnoty byly signifikantně vyšší u myší vakcinovaných ovalbuminem.

**Tab. 8: Statistické vyhodnocení obsahu protilátek proti slinám klíštěte.** Červeně jsou označeny výsledky, které byly vyhodnoceny jako signifikantní.

1. pokus					
Skupiny myší	F (hodnota testovacího kritéria)	df (stupně volnosti)	p (hladina významnosti)	SS (suma čtverců)	SM (suma čtverců(df))
CIR vs. OVAL vs. kontrola	12,72	2	0,006	0,02907	0,01454

Skupiny myší	Průměrné hodnoty absorbance ± SEM	q (hodnoty testovacího kritéria)	p (hladina významnosti) □ 0,05		
CIR vs. OVAL	0,09017 ± 0,00377 0,1757 ± 0,02300	6,195	Ano		
CIR vs. kontrola	0,09017 ± 0,00377 0,09067 ± 0,00532	0,03623	Ne		
OVAL vs. kontrola	0,1757 ± 0,02300 0,09067 ± 0,00532	6,158	Ano		
2. pokus					
Skupiny myší	F (hodnota testovacího kritéria)	df (stupně volnosti)	p (hladina významnosti)	SS (suma čtverců)	SM (suma čtverců(df))
CIR vs. OVAL vs. kontrola	17,88	2	0,0001	0,008478	0,004239
Skupiny myší	Průměrné hodnoty absorbance ± SEM	q (hodnoty testovacího kritéria)	p (hladina významnosti) □ 0,05		
CIR vs. OVAL	0,1447± 0,004807 0,03958± 0,002344	8,194	Ano		
CIR vs. kontrola	0,1447± 0,004807 0,1303± 0,009482	2,208	Ne		
OVAL vs. kontrola	0,03958± 0,002344 0,1303± 0,009482	5,913	Ano		
3. pokus					
Skupiny myší	F (hodnota testovacího kritéria)	df (stupně volnosti)	p (hladina významnosti)	SS (suma čtverců)	SM (suma čtverců(df))
CIR vs. OVAL vs. kontrola	5,642	2	0,0149	0,02043	0,01022
Skupiny myší	Průměrné hodnoty absorbance ± SEM	q (hodnoty testovacího kritéria)	p (hladina významnosti) □ 0,05		
CIR vs. OVAL	0,1755± 0,01998 0,09367± 0,003676	4,711	Ano		
CIR vs. kontrola	0,1755± 0,01998 0,1253± 0,02220	2,888	Ne		
OVAL vs. kontrola	0,09367± 0,003676 0,1253± 0,02220	1,823	Ano		

## 5. Diskuze

Cystatiny hrají důležitou roli v regulaci trávení, obranných mechanismů klíštěte a mohou ovlivnit i imunitní systém hostitele. Jejich imunomodulační účinky byly již několikrát prokázány a to nejen u několika druhů klíšťat, např. u *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis et al., 2008) nebo u *Ornithodoros moubata* (Salát et al., 2010), ale i u dalších parazitických organismů, např. u parazitických nematod *Onchocerca volvulus* (Schierack et al., 2003) nebo *Litomosoides sigmodontis* (Pfaff et al., 2002). O cystatinech se uvažuje jako o molekulách, které by mohly být vhodné pro vytvoření vakcíny proti parazitům, čili také proti klíšťatům. S několika cystatiny již byly provedeny úspěšné imunizační pokusy. Z toho důvodu byl v rámci této studie testován vakcinační potenciál cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*.

Cystatin z klíštěte *I. ricinus* byl připraven jako rekombinantní protein s využitím bakulovirového expresního systému. Vliv imunizace tímto proteinem na schopnost sání klíšťat byl testován v rámci vakcinačních pokusů na myších. Předpokládalo se, že ve všech třech provedených pokusech dojde k větší úmrtnosti nymf klíštěte *I. ricinus* sajících na imunizovaných myších oproti dvěma kontrolním skupinám (nevakcinované a vakcinované ovalbuminem). Očekávána byla také nižší hmotnost klíšťat, která dokončila sání a také jejich snížená schopnost vývoje do stadia dospělého.

Předpokládaný efekt imunizace nebyl pozorován. Nedošlo k výrazným rozdílům mezi klíšťaty, která sála na výše zmíněných skupinách myší. Rozdíl byl pozorován pouze v jednom případě prvního sání klíšťat na myších imunizovaných ovalbuminem, kdy bylo schopno dokončit sání signifikantně vyšší množství klíšťat (94,5%) než u těch, které byly vakcinovány cystatinem (72%). Avšak i u kontrolní neimunizované skupiny dokončilo sání pouze 72% klíšťat. Vliv imunizace na hmotnost nasátých klíšťat nebyl prokázán. Na rozdíl od našich výsledků, v pokusech s jiným cystatinem, sialostatinem L2, měla imunizace vliv na sání klíšťat. Tato molekula blokovala sání nymf *Ixodes scapularis* a docházelo také k redukci hmotnosti klíšťat po nasátí (Kotsyfakis et al., 2008). To může být vysvětleno tím, že v těchto pokusech byl používán jiný hostitel, imunizována byla morčata.

Imunizace CIR nezpůsobila výraznější mortalitu klíšťat po nasátí, 96% klíšťat bylo schopných se vyvinout do dalšího stadia. U kontrolní skupiny se do dalšího stadia přeměnila všechna klíšťata, u skupiny imunizované kontrolním proteinem v průměru 90% klíšťat. Protilátky přijaté s krví tedy nejspíše nemají schopnost blokovat funkci cystatinu ve stěvě, jako tomu mohlo být u cystatinu z klíštěte *Ornithodoros moubata*, OmC2 (Salát et al., 2010),

ani nenarušují stěnu střeva, jako je tomu u protilátek proti antigenu Bm86 u komerční vakcíny (Willadsen, 2004).

V jednom z pokusů byl zaznamenán vliv protilátek na délku sání klíšťat. U myši s nejvyšším množstvím protilátek proti cystatinu došlo ke zpomalení sání, klíšťata dokončila sání až po 4-5 dnech, oproti tomu u myši s nejnižším titrem dokončila sání všechna klíšťata již po 4 dnech. V dalších pokusech se tento trend neopakoval, nebylo dosaženo stejně vysokého titru protilátek. Ke zvýšení titru protilátek v krvi by mohlo vést zvýšení vakcinační dávky nebo její další opakování.

Pokud by cystatin fungoval jako exponovaný antigen přítomný ve slinách, po každém sání klíšťat by mělo docházet ke zvyšování produkce protilátek u vakcinovaných jedinců (Mulenga et al., 1999). Proto jsme provedli pokus, který měl ověřit, jestli sání klíšťat na imunizovaných myších zvyšuje množství protilátek proti cystatinu v krvi. Výsledky nepotvrdily, že by k tomuto efektu docházelo. Důvodem byl zřejmě fakt, že k produkci mRNA pro cystatin ve slinných žlázách podle Perner (2008) dochází až velice pozdě, poslední den sání klíšťete, a z toho důvodu se se slinami klíšťete do hostitele nedostane dostatečné množství cystatinu k tomu, aby vyvolal produkci dalších protilátek. U Sialostatinu L docházelo k růstu titru protilátek po sání klíšťat, což dokazuje, že tento cystatin byl ve slinách přítomný v dostatečném množství a byl rozpoznáván imunitním systémem vakcinovaných jedinců (Kotsyfakis et al., 2008).

Vzhledem k tomu, že k produkci mRNA pro CIR ve slinných žlázách dochází až poslední den sání klíšťete (Perner, 2008), je pravděpodobné, že tento protein nejspíše nemá imunomodulační účinky, jak je tomu u cystatinů z klíšťete *I. scapularis*, sialostatinu L a L2 (Kotsyfakis et al., 2006; Kotsyfakis et al., 2008). Oproti tomu ve střevě dochází k produkci CIR už první den přísátí k hostiteli a transkripční aktivita stoupá s dobou sání (Perner, 2008). CIR by tedy mohl patřit spíše mezi skryté antigeny. Podobně také u cystatinu z klíšťete *Haemaphysalis longicornis* Hlcyst-2 také nebyly prokázány imunomodulační účinky. Tento cystatin je přítomný hlavně ve střevě a ve slinných žlázách přítomný není a je spojen s přirozenou imunitou klíšťete (Zou et al., 2006).

Výsledky pokusu, který měl ukázat, zda imunizace cystatinem zvyšuje rozpoznatelnost dalších proteinů obsažených ve slinách klíšťat, jsou rozporuplné. U dvou pokusů se hypotéza potvrdila oproti kontrolnímu proteinu, ale oproti neimunizované kontrole nebylo dosaženo signifikantních výsledků. U prvního pokusu bylo dosaženo opačného výsledku. Nepodařilo se tedy statisticky prokázat, že by měla imunizace cystatinem vliv na rozpoznatelnost dalších proteinů. To také může souviset s tím, že CIR zpočátku ve slinách není přítomný, proto

nemůže ovlivňovat rozpoznání ostatních antigenů ve slinách klíštěte a nemůže působit na produkci protilátek proti těmto proteinům.

Cystatin z klíštěte *I. ricinus* se podle výsledků této práce nezdá být vhodným antigenem pro vytvoření vakcíny proti klíšťatům. Ačkoli se vakcinačními pokusy nepodařilo prokázat, že by tento protein poskytoval ochranu proti sání klíšťat, mohl by být využit např. k analýzám, které by se týkaly obecných funkcí cystatinů. Stejně tak tomu bylo u cystatinu ze střeva gastrointestinální hlístice *Haemonchus contortus*. S touto molekulou se také nepodařila po imunizaci prokázat ochrana proti infekci hlísticí, ale díky tomuto proteinu je možné lépe pochopit, jakou funkci mají cystatiny u těchto organismů, což také může vést k úspěšnějším imunizačním pokusům (Newlands et al., 2002).

Také by mohly být provedeny další vakcinační pokusy s CIR za použití jiných hostitelů, například králíků nebo morčat, u kterých by se mohl objevit určitý efekt imunizace, a s dosaženými výsledky by se dalo dále pracovat. K této myšlence nás vede to, že úspěšné imunizace s cystatiny z klíštěte *I. scapularis* byly provedeny na morčatech (Kotsyfakis et al., 2008).

## 6. Závěr

Byl připraven rekombinantní cystatin z klíštěte *Ixodes ricinus* v expresním bakulovirovém systému. Protein byl použit k experimentálním imunizacím myší pro zjištění možného vakcinačního potenciálu. Byl sledován vliv vakcinace na sání klíšťat, na jejich hmotnost po nasátí a schopnost přeměny do dalšího stadia. Testován byl také vliv sání klíšťat na obsah protilátek v krvi a zda imunizace cystatinem ovlivňuje rozpoznatelnost dalších proteinů obsažených se slinách klíštěte. Nepodařilo se prokázat vliv imunizace cystatinem z klíštěte *Ixodes ricinus* na sání a přežívání klíšťat.

## 6. Přehled literatury

**Agyei A.D., Runham N.V. 1995:** Studies on the Morphological Changes in the Midguts of Two Ixodid Tick Species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* During Digestion of the Blood Meal. *International Journal of Parasitology* 25: 55–62.

**Askenase P.W., 1977:** Role of Basophils, Mast Cells, and Vasoamines in Hypersensitivity Reactions with a Delayed Time Course. *Prog Allergy* 23: 199-320.

**Barrett A.J., Fritz H., Grubb A., Isemura S., Järvinen M., Katunuma N., Machleidt W., Müller-Esterl M., Sasaki M., Turk V., 1986:** Nomenclature and Classification of the Proteins Homologous with The Cysteine-proteinase Inhibitor Chicken Cystatin. *Biochemical Journal* 236(1): 312.

**Brguljan P.M. , Cimerman N., 2007:** Human Cystatin C. *Turkish Journal of Biochemistry* 32(3): 95-103.

**Brown S.J., Askenase P.W., 1983:** Immune Rejection of Ectoparasites (Ticks) by T Cell and IgG1 Antibody Recruitment of Basophils and Eosinophils. *Federation Proceedings* 42: 1744-1749.

**Brown W.M., Dziegielewska K.M., 1997:** Friends and Relations of the Cystatin Superfamily New Members and Their Evolution. *Protein Science* 6: 5-12.

**Dai J., Wanq P., Adusumili S., Booth C.J., Narasimhan S., Anquita J., Fikriq E. 2009:** Antibodies Against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host and Mikrobe* 6: 482-92.

**Garg R., Juncadella I.J., Ramamoorthi N., Ashish, Ananthanarayanan S.K., Thomas V., Rincón M., Krueger J.K., Fikrig E., Yengo Ch.M., Anguita J. 2006:** CD4 is the Receptor for the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology* 177: 6579-6583.

**Gaspar A.R., Crause J.C., Neitz A.W., 1995:** Identification of Anticoagulant Activities in the Salivary Glands of the Soft Tick, *Ornithodoros savignyi*. *Experimental and Applied Acarology* 19: 117-27.

**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: 4319-4326.

**Grunclová L., Horn M., Vancová M., Sojka D., Franta Z., Mareš M., Kopáček P. 2006:** Two Secreted Cystatins of the Soft Tick *Ornithodoros moubata*: Differential Expression Pattern and Inhibitory Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 387: 1635-1644.

- Guo X., Booth C.J., Paley M.A., DePonte K., Fikrig E., Narasimhan S., Montgomery R.R. 2009:** Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infection and Immunity* 77: 2320-9.
- Hellwage J., Meri T., Heikkilä T., Alitalo A., Panelius J., Lahdenne P., Seppälä I.J.T., Meri S. 2000:** The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(11): 8427-8435.
- Hovius W. R., Levi M., Fikrig E. 2008:** Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. *PLoS Medicine* 5(2): e43.
- Chalaise K. C., Kim T. K., Rodriguez H. G., Mulenga A. 2010:** *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) Tick Salivary Gland Serine Protease Inhibitor (Serpins) 6 is Secreted Into Tick Saliva During Tick Feeding. *The Journal of Experimental Biology* 214: 665-673.
- Chmelař J., Oliveira C. J., Řezáčová P., Francischetti I. M. B., Kovářová Z., Pejler G., Kopáček P., Ribeiro J. M. C., Mareš M., Kopecký J., Kotsyfakis M. 2010:** A Tick Salivary Protein Targets Cathepsin G and Chymase and Inhibits Host Inflammation and Platelet Aggregation. *The Journal of The American Society of Hematology* 117: 736-744.
- Jaworski D.C., Simmen F.A., Lamoreaux W., Coons L.B., Muller M.T., Needham G.R. 1995:** A Secreted Calreticulin Protein in Ixodid Tick (*Amblyomma americanum*) Saliva. *The Journal of Insect Physiology* 41: 369-375.
- Jones L. D., Hodgson E., Nuttall P. A. 1989:** Enhancement of Virus Transmission by Tick Salivary Glands. *The Journal of General Virology* 70: 1895-1898.
- Juncadella I. J., Garg R., Ananthnarayanan S. K., Yengo Ch. M., Anguita J. 2007:** T-cell Signaling Pathways Inhibited by the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49(3): 433-438.
- Karczewski J., Endris R., Connolly T. M. 1994:** Disagregin is a Fibrinogen Receptor Antagonist Lacking the Arg-Gly-Asp Sequence from the Tick, *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Biological Chemistry* 269(9): 6702-6708.
- Karim S., Miller N. J., Valenzuela J., Sauer J. R., Mather T. N. 2005:** RNA-mediated Gene Silencing to Assess the Role of Synaptobrevin and Cystatin in Tick Blood Feeding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(4): 1336-1342.



- Kotsyfakis M., Anderson J. M., Andersen J. F., Calvo E., Francischetti I. M. B., Mather T. N., Valenzuela J. G., Ribeiro J. M. C. 2008:** Cutting Edge: Immunity against a “Silent” Salivary Antigen of the Lyme Vector *Ixodes scapularis* Impairs Its Ability to Feed. *The Journal of Immunology* 181: 5209-5212.
- Kotsyfakis M., Horká H., Salát 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 Microbiology* 77(2): 456-470.
- Kotsyfakis M., Karim S., Andersen J. F., Mather T. N., Ribeiro J. M. C. 2007:** Selective Cysteine Protease Inhibition Contributes to Blood-feeding Success of the Tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 29256-29263.
- Kotsyfakis M., Sa-Nunes A., Francischetti I. M. B., Mather T. N., Andersen J. F., Ribeiro J. M. C. 2006:** Antiinflammatory and Immunosuppressive Activity of Sialostatin L, a Salivary Cystatin from the Tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281(36): 26298-26307.
- Kotyza J., Křepela E. 2002:** Proteases and Antiproteases in Health and Disease – a Review III. Cysteine Proteases and Their Natural Inhibitors. *Biomarkers and Environment* 5(1): 2-17.
- Labuda M., Trimmell A.R., Ličková M., Kazimírová M., Davies G.M., Lissina O., Hails R.S., Nuttall P.A. 2006:** An Antivector Vaccine Protects Against a Lethal Vector-borne Pathogen. *PloS Pathogens* 2: e27.
- Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen A., Godfroid E. 2002:** Characterization of a Novel Salivary Immunosuppressive Protein from *Ixodes ricinus* Ticks. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 10083-10089.
- Mathias M. I. C., Furquim K. C. S., Nunes P. H., 2011:** Immunomodulatory Effects of Tick Saliva. *Information Systems Journal* 8: 231-240.
- Matsuda H., Fukui K., Kiso Y., Kitamura Y., 1985:** Inability of Genetically Mast Cell-deficient W/W<sup>v</sup> Mice to Acquire Resistance against Larval *Haemaphysalis longicornis* Ticks. *The Journal of Parasitology* 71: 443-448.
- Matsuda H., Watanabe N., Kiso Y., Hirota S., Ushio H., Kannam Y., Azuma M., Koyama H., Kitamura Y., 1990:** Necessity of IgE Antibodies and Mast Cells for Manifestation of Resistance against Larval *Haemaphysalis longicornis* Tick in Mice. *The Journal of Immunology* 144: 259-262.

- McKenna R.V., Riding G.A., Jarmey J.M., Pearson R.D., Willadsen P. 2007:** Vaccination of Cattle against *Boophilus microplus* Using a Mucin-like Membrane Glycoprotein. *Parasite Immunology* 20: 325-336.
- Montgomery R. R., Lusitani D., de Boisfleury Chevance A., Malawista S. E. 2004:** Tick Saliva Reduces Adherence and Area of Human Neutrophils. *Infection and Immunity* 72(5): 2989-2994.
- Mulenga A., Sugimoto Ch., Onuma M. 2000:** Issues in Tick Vaccine Development: Identification and Characterization of Potential Candidate Vaccine Antigens. *Microbes and Infection*. 2(11): 1353-1361.
- Mulenga A., Sugimoto Ch., Sako Y., Ohashi K., Musoke A., Shubash M., Onuma M. 1999:** Molecular Characterization of a *Haemaphysalis longicornis* Tick Salivary Gland-associated 29-kilodalton Protein and its Effect as a Vaccine Against Tick Infestation in Rabbits. *Infection and Immunity* 67: 1652-1658.
- Mulenga A., Sugino M., Nakajima M., Sugimoto Ch., Onuma M. 2001:** Tick-encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. *The Journal of Veterinary Medical Science* 63: 1063-1069.
- Newlands G. F. J., Skuce P. J., Knox D. P., Smith W. D. 2001:** Cloning and Expression of Cystatin, a Potent Cysteine Protease Inhibitor from the Gut *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 122: 371-378.
- Nuttall P. A., 1999:** Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 492-505.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2004:** Tick-host Interactions: Saliva-activated Transmission. *Parasitology* 129: 177-189.
- Nuttall P. A., Paesen G. C., Lawrie C. H., Wang M. 2000:** Vector-host interactions in disease transmission. *The Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2(4): 381-386.
- Nuttall P.A., Trimmell A.R., Kazimírová M., Labuda M. 2006:** Exposed and Concealed Antigens as Vaccine Targets for Controlling Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasite Immunology* 28: 155-163.
- Oliveira C. J. F., Sá-Nunes A., Francischetti I. M. B., Carregaro V., Anatriello E., Silva J. S., de Miranda Santos I. K. F., Ribeiro J. M. C., Ferreira B. R. 2011:** Deconstructing Tick Saliva Non-protein Molecules with Potent Immunomodulatory Properties. *The Journal of Biological Chemistry* 286(13): 10960-10969.

- Pernas M., Sanchez-Monge R., Gomez L., Salcedo G. 1998:** A Chestnut Seed Cystatin Differentially Effective against Cysteineproteinases from Closely Related Pests. *Plant Molecular Biology* 38(6): 1235-1242.
- Perner J. 2008:** Charakterizace cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity.
- Pfaff A. W., Schulz-Key H., Soboslay P. T., Taylor D. W., MacLennan K., Hoffmann W. H. 2002:** *Litomosoides sigmodontis* Cystatin Acts as an Immunomodulator During Experimental Filariasis. *International Journal of Parasitology* 32(2):171-178.
- Prevot P., Beschin A., Lins L., Beaufays J., Grosjean A., Bruys L., Adam B., Brossard M., Brasseur R., Boudjeltia K. Z., Vanhamme L., Godfroid E. 2009:** Exosites Mediate the Anti-inflammatory Effects of a Multifunctional Serpin from the Saliva of the Tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS Journal* 276(12): 3235-3246.
- Salát J., Paesen G. C., Řezáčová P., Kotsyfakis M., Kovářová Z., Šanda M., Majtán J., Grunclová L., Horká H., Andersen J. F., Brynda J., Horn M., Nunn M. A., Kopáček P., Kopecký J., Mareš M. 2010:** Crystal structure and Functional Characterization of an Immunomodulatory Salivary Cystatin from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *Biochemical Journal* 429: 103-112.
- Schierack P., Lucius R., Sonnenburg B., Schilling K., Hartmann S. 2003:** Parasite Specific Immunomodulatory Functions of Filarial Cystatin. *Infection and Immunity* 71: 2422–2429.
- Schuijt T.J., Coumou J., Narasimhan S., Dai J., DePonte K., Wouters D., Brouwer M., Oei A., Roelofs J.J.T.H., van Dam A. P., van der Poll T., van 't Veer K., Hovius J.W. and Fikrig E. 2011:** A Tick Mannose-binding Lectin Inhibitor Interferes with the Vertebrate Complement Cascade to Enhance the Transmission of the Lyme Disease Agent. *Cell Host and Microbe* 10(2): 136-146.
- Schuijt T. J., Narasimhan S., Daffre S., DePonte K., Hovius J. W. R., van't Veer C., van der Poll T., Bakhtiari K., Meijers J. C. M., Boder E. T., van Dam A. P., Fikrig E. 2011:** Identification and Characterization of *Ixodes scapularis* Antigens That Elicit Tick Immunity Using Yeast Surface Display. *PloS One* 6(1): e15926.
- Singh S. K., Girschick H. J. 2003:** Tick-host Interactions and Their Immunological Implications in Tick-borne Diseases. *Current Science* 85: 1284-1298.
- Skallová A., Iezzi G., Ampenberger F., Kopf M., Kopecký J. 2008:** Tick Saliva Inhibits Dendritic Cell Migration, Maturation, and Function while Promoting Development of Th2 Responses. *The Journal of Immunology* 180: 6186-6192.

- Titus R. G., Bishop J. V., Mejia J. S. 2006:** The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for These Factors to Serve as Vaccine Targets to Prevent Pathogen Transmission. *Parasite Immunology* 28(4): 131-141.
- Trimnell A.R., Hails R.S., Nuttall P.A. 2002:** Dual Action Ectoparasite Vaccine Targeting ‘Exposed’ and ‘Concealed’ Antigens. *Vaccine* 20: 3560-3568.
- Tsuda A., Mulenga A., Sugimoto Ch., Nakajima M., Ohashi K., Onuma M. 2001:** cDNA Cloning, Characterization and Vaccine Effect Analysis of *Haemaphysalis longicornis* Tick Saliva Proteins. *Vaccine* 19: 4287-4296.
- Turk V., Bode W. 1991:** The Cystatins: Protein Inhibitors of Cysteine Proteinases. *FEBS Letters* 285(2): 213-219.
- Tyson K., Elkins C., Patterson H., Fikrig E., de Silva A. 2007:** Biochemical and Functional Characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* Tick Salivary Protein that Inhibits the Complement Pathway. *Insect Molecular Biology* 16(4): 469-479.
- 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*. *The Journal of Biological Chemistry* 275(25): 18717-18723.
- Volf P., Horák P. a kol. 2007:** Paraziti a jejich biologie: 260-264.
- Vray B., Hartmannb S., Hoebekec J. 2002:** Review Immunomodulatory properties of cystatins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(9): 1503-1512.
- Willadsen P. 2004:** Anti-tick Vaccines. *Parasitology* 129: S367-S387.
- Willadsen P. 1997:** Novel Vaccines for Ectoparasites. *Veterinary Parasitology* 71: 202-222.
- Willadsen P., Eisemann C.H., Tellam R.L. 1993:** ‘Concealed’ Antigens: Expanding the Range of Immunological Targets. *Parasitology Today* 9: 132-135.
- Willadsen P., Bird P., Cobon G.S., Hungerford J. 1995:** Commercialisation of a Recombinant Vaccine Against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110: S43-S50.
- Willadsen P., Kemp D. H. 1988:** Vaccination with ‘Concealed’ Antigens for Tick Control. *Parasitology Today* 4(7): 196-198.
- Yamaji K., Tsuji N., Miyoshi T., Islam M. K., Hatta T., Alim A., Anisuzzaman M., Kushibiki S., Fujisaki K. 2009:** A salivary Cystatin, HISC-1, from the Ixodid Tick *Haemaphysalis longicornis* Play Roles in the Blood-feeding Processes. *Parasitology Research* 106: 61-68.
- Zhou J., Ueda M., Umemiya R., Battsetseg B., Boldbaatar D., Xuan X., Fujisaki K. 2006:** A Secreted Cystatin from the Tick *Haemaphysalis longicornis* and Its Distinct Expression Patterns in Relation to Innate Immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36(7): 527-535.