

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Přítomnost nízkomolekulárních imunomodulátorů**  
**ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus***

Bakalářská práce

**Simona Hauserová**

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Vedoucí katedry: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2016

Hauserová, S., 2016: Přítomnost nízkomolekulárních imunomodulátorů ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*. [Presence of low molecular weight immunomodulators in *Ixodes ricinus* tick saliva. Bc. Thesis, in Czech.] – 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotace

K úspěšnému dokončení krmení klíšťata využívají proteinové látky obsažené ve slinách, díky nimž jsou schopna potlačit imunitní reakci hostitele. U některých klíšťat (např. *Rhipicephalus sanguineus*) se ovšem zjistilo, že jsou ve slinách obsaženy i nízkomolekulární látky neproteinového charakteru. Cílem práce bylo zjistit, zda tyto neproteinové molekuly jsou přítomny ve slinách našich klíšťat *Ixodes ricinus*. V této práci se konkrétně jedná o prostaglandin E<sub>2</sub> a adenosin. Druhým cílem bylo pomocí PKA inhibitoru zhodnotit úlohu obou nízkomolekulárních složek (nebo alespoň jedné z nich) v supresi produkce cytokinu TNF-alfa vhodnými buňkami pomocí klíštěcích slin.

Ticks use proteinaceous molecules contained in their saliva to suppress immune response of the host to complete their successful feeding. In some ticks (e.g. *Rhipicephalus sanguineus*) presence of non-proteinaceous molecules was discovered. The aim of this work was to determine the amount of these molecules in the saliva of *Ixodes ricinus* tick. Namely, prostaglandin E<sub>2</sub> and adenosine were analyzed. The second aim of this work was to evaluate the role of both low molecular weight components (or at least one of them) in the suppression of TNF-alfa cytokine production in suitable cells by ticks saliva.

### Prohlášení

Bakalářská práce byla financována z grantu GAČR 31-14-25799 S.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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.....

.....  
Simona Hauserová

## *Poděkování*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli a vedoucímu práce Prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání zajímavého tématu bakalářské práce, cenné rady během jejího vypracovávání a především za trpělivost. Rovněž bych chtěla poděkovat panu J. Erhartovi za sběr klíšťat, p. Evě Výletové za pomoc s buněčnými liniemi a za školení o chodu laboratoře. Dále dlužím poděkování RNDr. Janě Páleníkové za naučení metody ELISA a především děkuji Ing. Davidu Kahounovi, Ph. D. za stanovení adenosinu ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*. V poslední řadě bych moc poděkovala nejlepšímu příteli Bc. Jakubovi Staňkovi za statistické vyhodnocení výsledků a spolužačkám/kolegyním za přínosnou kritiku a podnětné rady.*

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Identifikované proteiny ve slinných žlázách klíšťat.....	3
3.1.1	Imunomodulační proteiny .....	3
3.1.2	Antihemostatické proteiny .....	5
3.1.2.1	Inhibitory koagulační kaskády .....	5
3.1.2.2	Inhibitory agregace krevních destiček.....	7
3.1.3	Proteiny s antimikrobiální aktivitou .....	9
3.1.4	Proteázy, inhibitory proteáz .....	10
3.1.5	Další proteiny izolované ze slinných žláz klíšťat.....	11
3.2	Neproteinové molekuly s imunomodulačními vlastnostmi .....	11
3.2.1	Prostaglandin E <sub>2</sub> a jeho imunomodulační vlastnosti .....	11
3.2.1.1	PGE <sub>2</sub> receptory a jejich signální dráhy.....	12
3.2.1.2	PGE <sub>2</sub> a aktivita buněk vrozené imunity.....	13
3.2.1.3	PGE <sub>2</sub> a indukce antigen specifické imunitní odpovědi .....	13
3.2.1.4	PGE <sub>2</sub> a regulace imunitní odpovědi .....	14
3.2.2	Adenosin a jeho imunomodulační vlastnosti.....	16
3.2.2.1	Adenosinové receptory a jejich signální dráhy .....	16
3.2.2.2	Adenosin a jeho vliv na imunitní systém .....	17
3.2.2.3	Adenosin a jeho imunomodulační účinky .....	18
3.2.2.4	Adenosin a rakovina.....	19
3.3	Adenosin a PGE <sub>2</sub> u hematofágních členovců.....	20
4	MATERIÁL A METODY .....	21
4.1	Materiál .....	21
4.1.1	Klíštěcí sliny.....	21
4.1.2	Buněčné linie.....	21
4.1.3	Standard PGE <sub>2</sub> , inhibitor H-89 a LPS mitogen .....	21
4.2	Metody .....	22
4.2.1	Stanovení obsahu PGE <sub>2</sub> ve slinách klíštěte Ixodes ricinus.....	22
4.2.1.1	Příprava reagensů a vzorků .....	22
4.2.1.2	Vlastní provedení .....	23
4.2.2	Stanovení obsahu adenosinu u klíštěte Ixodes ricinus .....	24
4.2.2.1	Princip LC-MS/MS metody .....	24
4.2.2.2	Použité chemikálie a činidla.....	25

4.2.2.3	Příprava vzorku klíštěcích slin .....	25
4.2.2.4	Příprava kontrolních vzorků.....	25
4.2.3	Vliv PGE <sub>2</sub> a inhibitoru H-89 na produkci TNF- $\alpha$ buněčnou linií IC-21 .....	26
4.2.3.1	Příprava buněk a reagensí .....	26
4.2.3.2	Inhibice TNF- $\alpha$ pomocí PGE <sub>2</sub> a její ovlivnění H-89 .....	26
4.2.3.3	Měření produkce TNF- $\alpha$ .....	27
4.2.4	Vliv PGE <sub>2</sub> a inhibitoru H-89 na produkci TNF- $\alpha$ makrofágovými liniemi IC-21 a PMJ-2R (modifikace postupu) .....	27
4.2.5	Vliv PGE <sub>2</sub> , inhibitoru H-89 a klíštěcích slin na produkci TNF- $\alpha$ makrofágovými liniemi .....	28
4.2.5.1	Stanovení proteinu v klíštěcích slinách .....	28
4.2.6	Statistické vyhodnocení.....	29
5	VÝSLEDKY .....	30
5.1	Stanovení obsahu PGE <sub>2</sub> v klíštěcích slinách .....	30
5.2	Stanovení obsahu adenosinu v klíštěcích slinách.....	32
5.3	Vliv PGE <sub>2</sub> a H-89 na produkci cytokinu TNF- $\alpha$ .....	34
5.4	Vliv PGE <sub>2</sub> , H-89 a klíštěcích slin na produkci cytokinu TNF- $\alpha$ .....	37
6	DISKUZE.....	40
7	ZÁVĚR .....	45
8	SEZNAM LITERATURY .....	46

## Seznam použitých zkratek

AA	arachidonová kyselina
ADA	adenosindeamináza
Ado	adenosin
ADP, AMP, ATP	adenosin di-, mono-, trifosfát
Ag	antigen
APC	antigen prezentující buňky (angl. antigen presenting cells)
aPTT	aktivovaný částečný tromboplastinový čas
ATB	antibiotikum
BIF	B-cell inhibitory factor
BIP	binding inhibitor protein
BOFES	bovinní fetální sérum
BPTI	bovine pancreatic trypsin inhibitor
BSA	bovinní sérový albumin
CAP	(cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCL	chemokinový ligand
CD	cluster designation
CHBP	chemokine binding proteins
CNS	centrální nervový systém
CREB	transkripční faktory nazývané CREB (cyclic AMP response element-binding protein)
CTL	cytotoxické T lymfocyty
CRT	kalretikulin
DCs	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymoimunanalýza (angl. enzyme linked immunosorbent assay)
EP	„E-prostanoid“ receptor
fXaI	factor Xa inhibitor
GC/MS	gas chromatography-mass spectrometry
GL	L-glutamin
GPCRs	G protein-coupled receptors
H-89	specifický inhibitor PKA

HILAP	<i>Haemaphysalis longicornis</i> leucin aminopeptidase
HICPL-A	<i>H. longicornis</i> catepsin L protein-A
HRP	peroxidáza (angl. horseradish peroxidase)
IDO	indoleamin 2,3 deoxygenáza
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
iNKT	invariantní NKT buňky
Ir-CPI	<i>Ixodes ricinus</i> contact phase inhibitor
Ir-LBP	<i>Ixodes ricinus</i> lipocalin binding protein
IRS	inzulin receptorový substrát
JAK3	tyrosin proteinová kináza
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MDSCs	myelodní supresorové buňky
ME	2-merkptoetanol
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MP	metaloproteáza
NK	přirozený zabíječ (angl. natural killer)
OMFREP	lektiny ze skupiny fibrinogenu podobných proteinů ( <i>Ornithodoros moubata</i> fibrinogen like protein)
PD-L1	programmed death-ligand 1
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	prostaglandinový prekurzor pro PGE <sub>2</sub>
PI-3K	fosfadylinositol-3 kináza
PKA	protein kináza A
PMNs	polymorfo-nukleární leukocyty
RGD	tripeptidová sekvence arginin-glycin-aspartát
SAT	slinami aktivovaný přenos (angl. saliva-activated transmission)
TAP	tick anticoagulant peptide
TF	transkripční faktor
TGFβ	transformující růstový faktor (angl. transforming growth factor β)

tHRF	tick histamine release factor
TIX-5	proteinový rekombinant
TLR	toll-like receptor
TMB	substrátový roztok tetramethylbenzidin
TNF	faktor nádorové nekrózy (angl. tumor necrosis factor)
TRAP	protein aktivovaný trombinem (angl. trombin activated protein)
TSGP	<i>Triatoma infestans</i> salivary gland proteins



# 1 Úvod

Klíšťata jsou krevsající ektoparazité, kteří potřebují k sání krve potlačit imunitu daného hostitele. Činí tak postupným uvolňováním proteinových a neproteinových molekul obsažených ve slinách s protisrážlivou, protizánětlivou a imunomodulační aktivitou. Díky tomu mohou klíšťata na svém hostiteli sát několik dní, úspěšně se nakrmí a dokončí životní cyklus. Několik těchto molekul bylo již charakterizováno a byly identifikovány jejich specifické funkce. Chitinázy, muciny, ixostatiny, cystatiny, defenziny, hyaluronidázy, proteiny s Kunitzovou doménou, lektiny a lipokaliny jsou známé jako proteinové molekuly, prostaglandiny a endokanabinoidy jako neproteinové molekuly (Dickinson et al., 1976; Ribeiro et al., 1985; Brown et al., 1985; Ferreira et al., 1999; Fezza et al., 2003; Valenzuela et al., 2004; Steen et al., 2006; Sá-Nunes et al., 2007 aj.).

Všechny molekuly přítomné v klíštěcích slinách či slinných žlázách jsou spojeny především s modulací různých kroků imunitní odpovědi hostitele, např. sialostatin L a PGE<sub>2</sub> inhibují maturaci DCs a brání prezentaci antigenu (Sá-Nunes et al., 2007, 2009). Da-p36 a SALP 15 inhibují proliferaci a aktivaci T buněk (Bergman et al., 1995; Anguita et al., 2002).

U neproteinových látek, PGE<sub>2</sub> a Ado, se podařil prokázat jejich vliv na diferenciaci buněk, produkci cytokinů a expresi kostimulačních molekul (Oliveira et al., 2011). Bližší specifikace výše zmíněných imunomodulátorů je popsána v následujících kapitolách, včetně charakterizace a identifikace proteinů, které rovněž významně ovlivňují imunitní reakce hostitele.

Protože byla větší pozornost dosud věnována proteinovým imunomodulátorům v klíštěcích slinách, bylo cílem této bakalářské práce objasnit, jakou úlohu v imunomodulaci způsobené klíštěcími slinami hrají nízkomolekulární látky, jmenovitě adenosin a prostaglandin E<sub>2</sub>.

## 2 Cíle práce

- 1) Literární rešerše o nízkomolekulárních imunomodulátorech v klíštěcích slinách.
- 2) Stanovení obsahu prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ve slinách *Ixodes ricinus*.
- 3) Stanovení obsahu adenosinu (Ado) ve slinách klíštěte *I. ricinus*.
- 4) Zhodnocení úlohy obou imunomodulátorů v supresi produkce cytokinu TNF- $\alpha$  vhodnými buňkami pomocí klíštěcích slin a PKA inhibitoru.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Identifikované proteiny ve slinných žlázách klíšťat

#### 3.1.1 Imunomodulační proteiny

Jednou z nejvýznamnějších molekul klíšťat se schopností potlačit imunitní odpověď hostitele během sání je rodina proteinů **SALP 15**. Zástupci těchto proteinů s molekulovou hmotností 15 kDa byly nalezeny u mnoha druhů klíšťat. Poprvé byly objeveny u klíštěte *Ixodes scapularis* (Anguita et al., 2002), později u *I. ricinus*, *I. persulcatus* a *I. pacificus* (Hovius et al., 2007; Hojgaard et al., 2009).

SALP 15 dokáže potlačit aktivaci a proliferaci CD4<sup>+</sup> T buněk. Vazba SALP 15 na CD4<sup>+</sup> buňky má za následek inhibici aktivace hydrolázy PLC $\gamma$ 1, snížení přísunu Ca<sup>2+</sup> iontů do buňky, a tím snížení produkce IL-2 (Garg et al. 2006; Juncadella et al., 2007). Byla prokázána i interakce s lidskými DCs, při které dochází ke snížení produkce protizánětlivých cytokinů vyvolané aktivací TLR a rovněž potlačuje aktivaci T-lymfocytů (Hovius et al., 2008).

Jiným proteinem je **SALP 20** (48 kDa), který inhibuje alternativní cestu aktivace komplementu navázáním na properdin C3 konvertázy. Byl získán z klíštěte *I. scapularis* (Tyson et al., 2007, 2008).

**Da-p36** (36 kDa) poprvé izolovaný ze slin klíštěte *Dermacentor andersoni* naopak potlačuje proliferaci T-lymfocytů zprostředkovanou mitogenem (Bergman et al., 2000). Později byl také získán z klíštěte *H. longicornis* (Alarcon-Chaidez et al., 2003).

U klíšťat *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *Amblyoma variegatum* a *Rhipicephalus appendiculatus* byl identifikován **imunoglobulin G** vázající protein o molekulové hmotnosti 27 kDa, který váže protilátky (Xu et al., 2008). Tyto proteiny jsou předpokládánou prvotní ochranou pro samotná klíšťata před přijatými hostitelovými protilátkami.

Protein **Isac** o molekulové hmotnosti 18,5 kDa objevený opět u *I. scapularis* je specifickým inhibitorem aktivace alternativní cesty komplementu (Valenzuela et al., 2000). Ze slinných žláz *I. ricinus* byly izolovány dvě isoformy genu pro tento protein. Byly pojmenovány jako Irac 1a Irac 2 a kódují proteiny o molekulové hmotnosti 20,3 a 19,6 kDa (Schroeder et al., 2007; Couvreur et al., 2008). Tyto proteiny se váží na properdin, což vede k inhibici C3 konvertázy.

Protein **Iris** o velikosti 43 kDa, který byl identifikován u klíštěte *I. ricinus*, inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 a navázáním na monocyty či makrofágy i sekreci TNF- $\alpha$  (Leboulle et al., 2002; Prevot et al., 2009).

**CHBPs** jsou proteiny schopné vázat chemotaktické cytokiny (chemokine binding proteins). **Evasin 1** o velikosti 10,4 kDa nalezený u *Rhiphicephalus sanguineus* (Frauensschuh et al., 2007) vykazuje vysokou specifitu pro chemokiny a značné protizánětlivé účinky v kůži. Další proteiny byly označeny jako **Evasin 3** o velikosti 7 kDa a **Evasin 4** o velikosti 12 kDa. Evasiny vykazují vysokou selektivitu k odlišným chemokinům, např.: Evasin 1 se váže na chemokiny CCL3, CCL4 a CCL18 (Frauensschuh et al., 2007; Déruaz et al., 2008).

Proteiny **ISL 929** a **ISL 1373**, získány ze slinných žláz *I. scapularis*, obsahují sekvence podobné cysteinové doméně metaloproteináz. ISL 929 a 1373 redukuje expresi B2 integrinů a zhoršují adheenci polymorfo-nukleárních leukocytů (PMNs), (Guo et al., 2009).

Dalším proteinem s imunomodulačními schopnostmi je **CRT** (calreticulin), jenž byl poprvé objeven ve slinách a slinných žlázách klíštěte *Amblyomma americanum* a později i u dalších druhů jako *R. microplus*, *Dermacentor variabilis*, *Haemaphysalis longicornis*, *I. scapularis* a *R. sanguineus* (Kaewhom et al., 2008). Přibližná velikost odpovídá 47,7 kDa. CRT je schopný vázat  $Ca^{2+}$  ionty a rovněž se váže na C1q složku komplementu, čímž inhibuje jeho aktivaci. Tímto krokem ovlivňuje hostitelovu imunitní odpověď, zvyšuje šanci na přežití a dokončení příjmu potravy klíštětem (Ferreira et al., 2002; Kaewhom et al., 2008; Parizi et al., 2009).

**Cystatiny**, objevené ve slinách klíštěte *I. scapularis* pojmenované jako **sialostatin L** a **sialostatin L2**, patří mezi imunosupresivní a protizánětlivé proteiny (Kotsyfakis et al., 2006, 2007). Oba vykazují inhibiční účinky na katepsiny, proteázy důležité při trávení proteinů z krve. Např. potlačují účinky katepsinu L, ale nepotlačují katepsin B a H. SialoL inhibuje katepsin C, čímž brání aktivaci serinové proteázy v granulech mnoha buněk (cytotoxické T-lymfocyty, NK buňky, žírné buňky, neutrofile), (Kotsyfakis et al., 2006). SialoL na rozdíl od SialoL2 silně potlačuje katepsin S. Vykazuje i inhibiční účinky na LPS indukovanou maturaci DCs. Vlivem SialoL dochází k poklesu produkce TNF- $\alpha$  a IL-12 v DC a snížení upregulace kostimulačních molekul. V jeho přítomnosti může být rovněž tlumena exprese CD80 a CD86 v DC po aktivaci LPS. SialoL2 inhibuje též papain a lidský

katepsin L a je spojován s úspěšným sáním klíštěte (nezbytný pro samotný příjem potravy), (Kotsyfakis et al., 2010). Dá se považovat za SAT faktor.

**IL-2 BP** inhibuje mitogenem zprostředkovanou proliferaci T-buněk. Dokáže potlačit produkci IL-2 a inhibuje funkce buněk exprimujících receptor pro IL-2. Tento protein byl získán z klíštěte *I. scapularis* (Gillespie et al., 2001).

Ve slinách klíšťat se nacházejí i látky, které potlačují proliferaci B-lymfocytů produkujících specifické protilátky. **BIP** protein o velikosti 18 kDa získaný od klíštěte *I. ricinus* inhibuje dělení B buněk pomocí mitogenu. Podobné účinky vykazuje **BIF** protein (13 kDa) nalezený u klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Hannier et al., 2004; Yu et al., 2006).

Ve slinách klíšťat *I. scapularis* byly objeveny i **karboxypeptidázy** (49,5 kDa) štěpící bradykinin, což je peptid odpovědný za bolest a svědění během sání (v místě sání dochází ke snižování citlivosti kůže), (Ribeiro et Mather, 1998).

Protein **japanin** izolovaný ze slinných žláz *R. appendiculatus* specificky reprogramuje reakce DCs na různé podněty. Mění expresi ko-stimulačních a ko-inhibičních molekul, sekreci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a polarizačních cytokinů T-buněk. Zároveň potlačuje diferenciaci DC (Preston et al., 2013).

**Hyalomin A** a **hyalomin B** jsou proteiny s imunoregulačními vlastnostmi. Byly získány ze slinných žláz klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum*. Hyalominy potlačují zánětlivé reakce hostitele a to buď snížením sekrece cytokinu TNF, chemotaktického proteinu pro monocyty (MCP-1) a interferonu IFN $\gamma$ , nebo zvýšením sekrece imunosupresivního cytokinu IL-10 (Wu et al., 2010).

**MIF** (macrophage migration inhibitory factor) je peptid, který byl nalezený ve slinných žlázách klíštěte *Amblyomma americanum*. Jeho hlavní funkce spočívá v inhibici migrace makrofágů (Jaworski et al., 2001).

### 3.1.2 Antihemostatické proteiny

#### 3.1.2.1 Inhibitory koagulační kaskády

Hemokoagulace, neboli srážení krve, je způsobeno postupnou aktivací koagulačních faktorů. Je součástí hemostázy, komplexního procesu, který brání ztrátám krve při poškození cév. Samotný proces hemokoagulace zahrnuje kaskádu enzymatických reakcí, kde je inaktivní proenzym přeměněn do aktivní formy, jež aktivuje další proenzymy. Klíčovou roli

sehrává trombin, který se účastní konečné společné cesty koagulační kaskádou a konvertuje fibrinogen na fibrin, jehož úlohou je pospojit volně agregované destičky a vytvořit definitivní sraženinu, trombus. Trombin může regulovat aktivitu krevních koagulačních faktorů a stimulovat reakce krevních destiček. Aby se mohla klíšťata nakrmit, vyvinula si ochranné mechanismy k zabránění nebo prodloužení krevní koagulace během sání (Koh et Kini, 2009; Kazimírová et al., 2010).

**Ixodegriny**, které byly objeveny u *I. pacificus* a *I. scapularis*, jsou látky reagující s fibrinogenem, čímž naruší jeho vazbu na trombocyty a fungují jako inhibitory krevních destiček (Francischetti et al., 2005).

**Ixolaris** je protein o velikosti 15,7 kDa, který je charakteristický obsahem dvou Kunitzových domén. Byl identifikován u klíšťete *I. scapularis*. Je znám jako inhibitor vnější cesty aktivace koagulační kaskády. Inhibuje faktorem VIIa/TF indukovaný faktor X. Ve svém nedenedurovaném stavu interaguje s faktory Xa a X. K inhibici komplexu faktorů VIIa/TF dochází při navázání ixolarisu na jeden ze zymogenů (proenzymů) faktoru X nebo do aktivního místa enzymu faktoru Xa. Prokázalo se i to, že ixolaris interaguje s faktorem X přes vazebné místo pro heparin, a tak inhibuje jeho aktivaci vnitřním tenázovým komplexem (Francischetti et al., 2002; Monteiro, 2005). **Pentalaris** obsahující 5 Kunitzových domén vykazuje podobné účinky. Inhibuje fVIIa a váže se na fXa, fX (ve vysokých koncentracích může inhibovat i fIX), (Francischetti et al., 2002, 2004).

Dalším klíšťecím antikoagulantem je **TAP** (tick anticoagulant peptide, 6 kDa) a fXaI (factor Xa inhibitor). TAP byl získán z *Ornithodoros moubata*. Jedná se o nízkomolekulární inhibitor serinových proteáz, který je podobný inhibitorům s Kunitzovou doménou, liší se ovšem v mechanismu inhibice proteáz (Waxman et al., 1990; Antuch et al., 1994). **FXaI** (7,2 kDa) izolován ze slin klíšťete *O. savignyi* je rovněž specifický inhibitor faktoru Xa. Stejně účinky vykazuje **Salp 14** o molekulové hmotnosti 9,8 kD izolovaný z *I. scapularis* (Narasimhan et al., 2002, 2004). Rekombinant **TIX-5** ze slin stejného klíšťete rovněž specificky inhibuje fXa, čímž inhibuje aktivaci fV faktorem X a tím zahájení tvorby trombinu (Schuijt et al., 2013).

**Haemaphysalin**, protein izolovaný z klíšťete *Haemophysalis longicornis*, zabraňuje aktivace kallikrein-kininového systému (kallikrein a fXIIa), což inhibuje vnitřní koagulační cestu (Kato et al., 2005).

Ze slinných žláz klíštěte *Dermacentor andersoni* byl izolován protein, jenž inhibuje faktor V a faktor VII v koagulační kaskádě. Složení tohoto proteinu není prozatím zjištěno (Gordon et Allen, 1991).

„**Basic tail**“ proteiny nalezené u klíšťat *I. scapularis* a *I. pacificus* se uplatňují proti srážení krve hostitele (Narasimhan et al., 2002). Basic tail proteiny vykazují podobnost s exogenními antikoagulanty jako je protein Salp 14 působící jako inhibitor fXa (Narasimhan et al., 2002, 2004).

Ze slinných žláz klíštěte *Ornithodoros moubata* byl izolován **ornithodorin**, protein o molekulové hmotnosti 12,6 kDa. Obsahuje modifikované Kunitzovy domény a je účinným a vysoce selektivním trombinovým inhibitorem (van de Locht et al., 1996).

U klíštěte *A. variegatum* jsou proteiny podobné hirudinu (Kazimírová et al., 2003), jež působí jako inhibitor trombinu (navázáním na trombin zabrání vzniku sraženiny, případně sraženinu rozpouští), (Fields, 1991). Např. **variegin** o velikosti 3,8 kDa byl objeven ve slinných žlázách tohoto klíštěte *A. variegatum*. Variegin je vysoce afinní inhibitor trombinu. Další proteiny jsou varieginu velmi podobné, protože obsahují varieginové sekvence a jsou příbuzné madaninům (Koh et al., 2007), což jsou malé antitrombiny (7kDa), které byly nazvány jako **madanin 1** a **madanin 2**. Byly získány ze slinných žláz klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. Madaniny inhibují přeměnu fibrinogenu na fibrin aktivovanou trombinem, trombinem katalyzovanou aktivaci fVa a fVIIIa a trombinem indukovanou agregaci trombocytů (Iwanaga et al., 2003).

**Longistatin** je aktivátorem plasminogenu, čímž přispívá k fibrinolýze. Byl izolován z klíštěte *H. longicornis* (Islam et al., 2011).

**Ir-CPI**, protein z klíštěte *Ixodes ricinus*, specificky ovlivňuje faktory fXIIa, fXIa a kallikrein a prodlužuje aktivovaný tromboplastinový čas aPTT *in vitro* (Decrem et al., 2009). Z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* byl získán protein o velikosti 65 kDa. Jedná se o antikoagulant ovlivňující různé složky protrombinového komplexu (Limo et al., 1991).

### 3.1.2.2 Inhibitory agregace krevních destiček

Většina proteinů inhibujících agregaci krevních destiček obsahuje Arg-Gly-Asp (RGD motiv). RGD motiv slouží k navázání daného proteinu na buněčnou membránu trombocytů – molekulu integrinů, které fungují jako receptory pro aktivační faktory jejich agregace (D'Souza et al., 1991).

Protein **variabilin** o velikost 5 kD izolovaný z klíštěte *D. variabilis* je antagonistou glykoproteinových receptorů IIb-IIIa a  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  pro fibrinogen a vitronectin (Wang et al., 1996).

**Savignigryn** patřící do rodiny BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor) Kunitzových receptorových proteinů, byl izolovaný z klíštěte *Ornithodoros savignyi*. Vyskytuje se ve čtyřech isoformách A+, A-, B+ a B- (A a B je označení pro konformační isoformu, + a - pro označení isoform vzniklých jako duplikáty). Molekulová hmotnost + isoformem je 7 kDa, - isoformem 6,8 kDa. Všechny isoformy savignigrynu inhibují agregaci aktivovaných trombocytů iniciovanou kolagenem, TRAP (trombin activated protein) či epinefrinem. Jsou schopny rozpojit trombocyty agregované za pomoci ADP a jsou vysoce specifické pro integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , povrchovou molekulu trombocytů (Mans et al., 2002). Dalším proteinem je **Savignin** (12,4 kDa), izolovaný ze slinných žláz stejného klíštěte. Hlavní funkcí je inhibice trombocytů indukovaná trombinem (Nienaber et al., 1999).

Ve slinnách *R. appendiculatus* byly objeveny proteiny zvané **lipocaliny**, které hrají důležitou roli v kontrole hemostatického systému svého hostitele (Montfort, Weichsel, Andersen, 2000). Lipocaliny dokážou vázat histamin, serotonin, imunoglobuliny, působí proti komplementu a mají vlastnosti toxinu (Sangamnatdej et al., 2002). U některých klíšťat se váží na C5 složku, a tím inhibují klasickou a alternativní cestu komplementu. Proteiny vázající histamin (**HPBI-3**) u tvrdých klíšťat regulují zánětlivou reakci při dlouhém krmení (Paesen et al., 1999, Sangamnatdej et al., 2002). Ve slinách některých klíšťat byl jako lipocalin určen protein moubatin a čtyři proteiny zvané **TSGP** (Mans et al., 2003), u kterých se nevyskytuje tzv. RGD motiv. U těchto proteinů je jiný mechanismus inhibice agregace trombocytů. **Moubatin** (17 kDa) získaný z klíštěte *Ornithodoros moubata*, inhibuje agregaci krevních destiček indukovanou kolagenem standardní cestou a potlačuje jejich agregaci i v plazmě. K inhibici dochází navázáním moubatinu na receptor pro tromboxan A<sub>2</sub> na povrchu krevních destiček, čímž dojde k vyblokování dráhy závislé na cyklooxygenáze (Keller et al., 1993). **TSGP** proteiny by mohly mít stejnou antihemostatickou aktivitu jako moubatin, především protein **TSGP 2** a **TSGP 3**. Ovšem tyto informace nebyly zatím vědecky podloženy (Mans et al., 2002).

Do rodiny lipocalinů patří rovněž protein zvaný **longicornin** (29 kDa), který je dalším inhibitorem kolagenem zprostředkované agregace trombocytů (sdílí společné místo s kolagenem). Longicornin byl izolován ze slin klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Cheng et al., 1999).



Jiným proteinem z rodiny lipocalinů, který byl zjištěný ve slinách klíštěte *I. ricinus*, je **Ir-LBP**. Jeho hlavní funkcí je inhibice chemotaxe neutrofilů *in vitro*. Ukázalo se, že *in vivo* snižuje množství aktivovaných neutrofilů v místě kousnutí, čímž oslabuje hostitelovu imunitní odpověď (Beaufays et al., 2008).

Ze slin klíštěte *O. moubata* se získal protein **disagregin** o velikosti 6 kDa. Disagregin inhibuje ADP – iniciovanou agregaci trombocytů v plazmě. Potlačuje agregaci vyvolanou kolagenem, epinefrinem, aktivačním faktorem trombocytů, trombinem a peptidovým receptorem pro trombin. Prokázalo se, že také částečně inhibuje adhezi krevních destiček na fibronectin a ovlivňuje jejich adhezi na kolagen (Karczewski et al., 1994).

Protein **apyráza** (ATP - adenosine triphosphate difosfohydroláza) patří mezi nejrozšířenější molekuly inhibující agregaci trombocytů. Poprvé byla objevena u *I. scapularis*. Pozděj byla identifikována u klíšťáků *O. moubata*, *O. savignyi* (Ribeiro et al., 1991; Mans et al., 1998). Apyráza blokuje aktivaci trombocytů. Inhibuje ADP a kolagenem indukovanou agregaci krevních destiček a zapřičiňuje disagregaci krevních destiček již agregovaných tím, že štěpí ADP na AMP a ATP na ADP, AMP a fosfát (Mans et al., 2000). Další isoformy apyrázy byly objeveny u klíšťat *R. appendiculatus* a *I. scapularis* (Stutzer et al., 2009).

Na druhou stranu **tHRF** (tick histamine release factor) protein sekretovaný ve slinách klíštěte *I. scapularis* (Dai et al., 2010), a inhibitor serinových proteáz serpin **IRS-2** z *I. ricinus*, který inhibuje katepsin G a chymázu (Chmelar et al., 2011), se pravděpodobně chovají jako modulátory vaskulární permeability (Chmelar et al., 2012).

### 3.1.3 Proteiny s antimikrobiální aktivitou

**Lektiny** jsou látky schopné rozpoznat povrchové molekuly erytrocytů a aglutinovat je, z čehož pochází jejich druhý název aglutinin (Boyd el. Shapleigh, 1954). Dnes jsou definovány jako proteiny, či glykoproteiny, s jedním vazebným místem pro sacharidy. Vykazují tzv. antimikrobiální aktivitu. Produkce lektinu byla potvrzena ve slinných žlázách a hemocytech klíšťat (Grubhoffer et Jindrak, 1998; Kovář et al., 2000; Rego et al., 2006). Poprvé byl izolován lektin o velikosti 37 kDa z klíštěte *O. moubata* a pojmenován jako **Dorin M**. Byly zaznamenány i jiné lektiny jako OMFREP a galektiny s vazbou k disacharidům. Později byly získány i z klíštěte *I. ricinus*, *O. tholozani*, *O. tartakovskyi*, *A. polonicus*, *R. appendiculatus* (Grubhoffer et al., 2004; Rego et al., 2005, 2006).

Propeptidy **HI-gut** a **HI-sal** (5,8 kDa, 6,5 kDa) jsou antibakteriální defensiny indukovatelné LPS. Byly objeveny ve slinných žlázách *H. longicornis* (Zhou et al., 2007).

**Ixosin** o velikosti 2,9 kDa izolovaný ze slinných žláz *I. sinensis* (Yu et al., 2006) a **ixosin B** o velikosti 3,8 kDa vykazují antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans* (Liu et al., 2008).

### 3.1.4 Proteázy, inhibitory proteáz

#### Aspartátové peptidázy

K aspartátovým proteázám se řadí jeden z nejdůležitějších proteinů, a to **longepsin**. Longepsin s molekulovou hmotností 39,3 kDa byl poprvé izolován ze slinných žláz a i střeva klíštěte *H. longicornis*. Tento protein se účastní proteolýzy hemoglobinu (Boldbaatar et al., 2006).

#### Metaloproteázy

Metaloproteázy identifikované u klíštěte *I. scapularis*, *I. ricinus* a *H. longicornis* (Harnnoi et al., 2007) se vyskytují ve třech isoformách značených **MP1** (molekulová hmotnost 37 kDa), **MP2** a **MP3**. Jsou charakteristické svou gelatinázovou a fibrinogenolytickou aktivitou (Francischetti et al., 2003).

#### Aminopeptidázy

**HILAP** (*Haemaphysalis longicornis* leucin aminopeptidase) je leucinová aminopeptidáza izolována z klíštěte *H. longicornis*, která byla získána u nasátých klíšťat z bazofilních buněk, kde hraje svou roli v biosyntéze a degradaci proteinů (Hatta et al., 2006, 2009 a 2010).

#### Cysteinové proteázy

**Hlcyst1** (11 kDa) je intracelulární cystatin izolovaný ze slinných žláz *H. longicornis*. Inhibuje klíštěcí katepsin HICPL-A (*H. longicornis* catepsin L protein-A) a degradaci hemoglobinu HICPL-A (Zhou et al., 2009; Yamaji et al., 2010).

### 3.1.5 Další proteiny izolované ze slinných žláz klíšťat

**SALP25D** o velikosti 24,6 kDa byl získán z klíšťete *I. scapularis*. Jedná se o homologa glutathionové peroxidázy. SALP25D je schopen katalyzovat redukci hydrogenperoxidu v přítomnosti redukováného glutathionu a glutathionreduktázy. Díky tomu se řadí mezi významné antioxidanty klíšťat (Das et al., 2001). **Salp 25** neutralizuje oxidační reakce vyvolané aktivovanými neutrofily (Das et al., 2001; Narasimhan et al., 2007).

**Salp 20, Isac a Isac-1** z klíšťete *I. scapularis* (Tyson et al., 2007; Valenzuela et al., 2000) a paralogy Isac **IRAC I a II** z *I. ricinus* (Schroeder et al., 2007) specificky inhibují tvorbu C3 konvertázy alternativní cesty aktivace komplementu blokací vazby faktoru B na složku C3b.

**Fosfolipáza A2**, objevená u klíšťete *A. americanum*, je pravděpodobně zodpovědná za hemolytickou aktivitu klíšťecích slin. Podobné účinky vykazuje i fosfolipáza C (Bowman et al., 1997).

Ze slinných žláz *H. logicornis* byl ještě získán enzym **peroxiredoxin** (26 kDa), který zabraňuje štěpení DNA oxidativním stresem (Tsuji et al., 2001).

## 3.2 Neproproteinové molekuly s imunomodulačními vlastnostmi

### 3.2.1 Prostaglandin E<sub>2</sub> a jeho imunomodulační vlastnosti

**Prostaglandiny** (PGEs) jsou deriváty kyseliny arachidonové (AA), produkované cyklooxygenázami a PG syntetázou. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) je bioaktivní lipid, nezbytný homeostatický faktor, jenž je také klíčovým mediátorem u chronických onemocnění, zánětu a rakoviny (Phipps et al., 1991).

Receptory pro PGE<sub>2</sub> (Hata et al., 2004) jsou přítomny u mnoha typů buněk a odrážejí jeho ubikviterní funkce, které zahrnují nocicepci a další aspekty neuronní signalizace, hematopoézy, regulace průtoku krve, renální filtrace a krevního tlaku, regulace svalové činnosti, vaskulární permeability a funkce hladkého svalstva (Durand et al., 2010; Nagamatsu et al., 2010; Rivest et al., 2010; Yuhki et al., 2010; Yang et al., 2008). PGE<sub>2</sub> má také významný vliv na regulaci imunitního systému a jeho různé obranné mechanismy.

PGE<sub>2</sub> (352 Da) byl studován jako biologický faktor již v 60. letech, kdy se ukázalo, že působí jako regulátor zánětu a funkcí různých buněk imunitního systému (Phipps et al.,

1991). Je schopen ovlivňovat aktivaci, maturaci a migraci dendritických buněk, tedy hlavních buněk během vývoje antigen-specifické imunity (Phipps et al., 1991; Harris et al., 2002).

PGE<sub>2</sub> může být produkován všemi typy buněk přes epiteliální, fibroblasty a buňky infiltrující zánět, které představují hlavní zdroj PGE<sub>2</sub> v rámci imunitní odpovědi. Proces syntézy PGE<sub>2</sub> zahrnuje fosfolipázu A<sub>2</sub>, která mobilizuje AA z buněčných membrán a cyklooxygenázy konvertující AA do PGH<sub>2</sub> a PGE syntetázu, nezbytnou pro finální tvorbu PGE<sub>2</sub> (Lambeau et al., 1999; Park et al., 2006).

Přestože inhibitory PGE<sub>2</sub>, jako jsou steroidy a nesteroidní protizánětlivé léky, představují běžná a efektivní farmaceutická agens, uplatnění plného potenciálu léčby cílené na PGE<sub>2</sub> při léčbě chronických infekcí, zánětů a rakoviny, je omezeno komplexním charakterem PGE<sub>2</sub> zprostředkované imunoregulace (Kalinski, 2012).

### **3.2.1.1 PGE<sub>2</sub> receptory a jejich signální dráhy**

Heterogenní efekty PGE<sub>2</sub> se odrážejí v přítomnosti čtyř odlišných receptorů označovaných jako EP1, EP2, EP3 a EP4. EP3 existuje u lidí minimálně v osmi formách a u myši ve třech. EP3 a EP4 představují vysoce afinní receptory, zatímco EP1 a EP2 vyžadují významně vyšší koncentrace PGE<sub>2</sub> pro efektivnější signalizaci (Sugimoto et al., 2007).

Signál přes dvojici receptorů spojených s G proteinem, EP2 a EP4, je řízen adenylátcyklázou spouštěnou cAMP/PKA/CREB dráhou, která zprostředkovává dominantní aspekty protizánětlivé a supresorové aktivity PGE<sub>2</sub> (Watabe et al., 1993; Regan et al., 1994; Fujino et al., 2005). Navzdory podobným funkcím jsou signalizace receptorem EP4 a EP2 řízeny různými koncentracemi PGE<sub>2</sub> a liší se i délkou trvání. EP4 signál je rapidně snížený při interakci s PGE<sub>2</sub>, zatímco EP2 signál je rezistentní k ligandem-indukované negativní regulaci, díky čemuž je schopen zprostředkovat dlouhotrvající efekt PGE<sub>2</sub> v pozdějším vývoji zánětu (Nishigaki et al., 1996).

Naopak signalizace pomocí EP1 receptoru zahrnuje uvolňování kalcia (Hata et al., 2004) a u většiny variant receptoru EP3 jde o signál přes dvojici Gi receptorů, které inhibují adenylátcyklázu (Sugimoto et al., 1992). Nicméně některé varianty jsou Gs a naznačují různou citlivost k ligandem-indukované negativní regulaci (Hata et al., 2004).

### 3.2.1.2 PGE<sub>2</sub> a aktivita buněk vrozené imunity

Ačkoliv je PGE<sub>2</sub> schopen vyvolat migraci neutrofilů (Yu et al., 1998), makrofágů (Nakayama et al., 2006) a žírných buněk (Weller et al., 2007) do místa zánětu, funkce buněk přirozené imunity ovlivňuje velmi odlišně.

Přítomnost PGE<sub>2</sub> inhibuje cytolytické obranné funkce „přirozených zabíječů“ (NK buněk), (Goto et al., 1983; Bankhurst et al., 1982) mechanismem, který zahrnuje supresi reakcí na IL-12 a IL-15 (Walker et al., 2004; Joshi et al., 2001) a nejpravděpodobněji na IL-2. Rovněž inhibuje produkci IFN- $\gamma$  a tím ruší jeho funkci jakožto pomocníka NKbuněk u DCs zprostředkující indukci imunitní odpovědi typu 1 (Th1) a CTL (cytotoxické T lymfocyty) imunitní odpovědi (Mailliard et al., 2005).

Dále se prokázalo, že PGE<sub>2</sub> inhibuje funkce granulocytů (Smith, 1977), čímž přispívá k defektní obraně hostitele po transplantaci kostní dřeně nebo přispívá k rakovině, stejně jako u jiných onemocnění spojených s nadprodukcí PGE<sub>2</sub> (Ballinger et al., 2006).

U alveolárních makrofágů omezuje PGE<sub>2</sub> jejich schopnost fagocytózy (Aronoff et al., 2004). Podporuje indukci žírných buněk (Hu et al., 1995), jejich lokální působení a degranulaci mechanismem, jenž zahrnuje EP1 a EP3 receptory (Nakayama et al., 2006; Wang et al., 2006; Weller et al., 2007; Gomi et al., 2000). Podporuje degranulačně nezávislou produkci proangiogenního a imunosupresivního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a MCP-1, které přispívají k aktivitě PGE<sub>2</sub> u rakoviny (Abdel-Majid et al., 2004).

### 3.2.1.3 PGE<sub>2</sub> a indukce antigen specifické imunitní odpovědi

PGE<sub>2</sub> potlačuje produkci IL-2 T lymfocyty (Walker et al., 1983; Rincón et al., 1988), a inhibuje tak aktivaci a expanzi Ag-specifických T buněk.

Mnohé studie ukázaly, že PGE<sub>2</sub> narušuje raná stádia diferenciac DCs (Kalinski et al., 1997), čímž přispívá k jejich lokální a systémové dysfunkci u rakoviny (Sharma et al., 2003; Sombroek et al., 2002; Heusinkveld et al., 2011). Tzv. „PGE<sub>2</sub>DCs“ buňky představují myeloidní supresorové buňky (MDSCs), které jsou schopné potlačit CTL odpověď (Obermajer et al., 2011). Nicméně PGE<sub>2</sub> má i své pozitivní vlivy. Podporuje indukci plně zralých DCs cestovat do lymfatických uzlin, kde efektivně působí při aktivaci naivních T buněk. Navíc přidáním PGE<sub>2</sub> k prozánětlivým cytokinům zahrnujícím IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  zrychluje maturaci DCs a zvyšuje expresi jejich kostimulačních molekul (Jonuleit et al., 1997; Rieser et al., 1997; Kalinski et al., 1998). Přesto, že PGE<sub>2</sub> zvyšuje produkci některých

supresivních faktorů, jako je IL-10 (Kalinski et al., 1997), thrombospondin-1 (Doyen et al., 2003), aIDO (Braun et al., 2005), jeho nejčastěji se vyskytujícím účinkem na maturaci DCs je zvýšení jejich schopnosti podporovat expanzi T buněk. Nicméně zralé DCs v přítomnosti PGE<sub>2</sub> rozvíjí odlišný „vyčerpávající“ fenotyp, který se manifestuje jejich zeslabenou schopností indukovat CTL-, Th1- a NK buněčnou imunitu typu 1 (Kalinski et al., 1998, 1999; Gustafsson et al., 2008), zatímco podporují vývoj Th2 (Kalinski et al., 1998). Tyto negativní vlivy jsou výsledkem potlačení prozánětlivých cytokinů, zejména IL-12p70 (Kalinski et al., 1998). CCR7 a CXCR4 představují dva chemokiny potřebné pro efektivní vstup T buněk do lymfatických uzlin (Campbell et al., 2003). Ačkoliv role PGE<sub>2</sub> v regulaci těchto chemokinů zůstává neznámá, zjistilo se, že potlačuje schopnost DCs produkovat CCL19 (CCR7 receptor), a blokovat tak T buňky (Muthuswamy et al., 2010).

PGE<sub>2</sub> a jeho inhibiční efekt na aktivaci a expanzi naivních T buněk zahrnuje i přímé supresorové vlivy na produkci IL-2 (Walker et al., 1983) a na expresi IL-2 receptoru a JAK3, který zprostředkovává odpověď T buněk na IL-2 (Rincón et al., 1988; Kolenko et al., 1999).

#### **3.2.1.4 PGE<sub>2</sub> a regulace imunitní odpovědi**

Bylo již uvedeno, že PGE<sub>2</sub> potlačuje produkci IL-2 a odpověď T buněk na tento cytokin. Nespecifickým způsobem potlačuje aktivaci a proliferaci těchto buněk. Už nízké koncentrace PGE<sub>2</sub> mají výrazný modulační efekt směřující odpověď CD4<sup>+</sup> T buněk od agresivní Th1 subpopulace k subpopulaci Th2 a Th17 buněk, které patří mezi méně destruktivní (Kalinski, 2012).

Na základě studií *in vitro* se ukázalo, že PGE<sub>2</sub> inhibuje produkci IFN- $\gamma$  (Th1), ale neinhibuje produkci IL-4 a IL-5 myšimi (Betz et al., 1991) a lidskými CD4<sup>+</sup> buňkami (Snijdwint et al., 1993). Kromě přímého účinku na CD4<sup>+</sup> buňky, supresorový efekt PGE<sub>2</sub> na Th1 subpopulaci spočívá i v jeho schopnosti potlačit produkci IL-12 v monocytech (van der Pouw et al., 1995) a DCs (Kalinski, 1997, 1998).

Th17 subpopulace produkuje cytokin IL-17, který hraje důležitou roli nejen v regulaci zánětu, ale ovlivňuje i imunitní odpověď proti některým extracelulárním patogenům (Labíková, 2011). Zvyšující se aktivita buněk Th17 díky vlivu PGE<sub>2</sub> souvisí s jeho schopností potlačit produkci IL-12p70, zatímco zvyšuje produkci IL-23, též produkovaného Th17 subpopulací (Khayrullina et al., 2008).

Myší modely ukázaly, že indukce aktivity CTL buněk proti virovým antigenům a aloantigenům je vysoce citlivá na zvýšení hladiny PGE<sub>2</sub> a cAMP (Hale et al., 1982; Plaut

et al., 1983). Inhibice CTL aktivity závislá na PGE<sub>2</sub> přispívá k imunosupresi u deciduálních tkání a tumorů (Lala et al., 1988; Parhar et al., 1988; Specht et al., 2001). PGE<sub>2</sub> umí potlačit schopnost plně zralých CTL buněk interagovat s jejich cíli a zabít nádorové buňky, rovněž je schopen potlačit vývoj CTL potlačením schopnosti DCs sekretovat IL-12 během interakce s naivními CD8<sup>+</sup> buňkami (Watchmaker et al., 2010). PGE<sub>2</sub> také zasahuje do vývoje B buněk (Phipps et al., 1991; Simkin et al., 1987), zvyšuje produkci IgE protilátek (Carini et al., 1981) a podporuje indukci, atrakci a degranulaci žírných buněk (Nakayama et al., 2006; Wang et al., 2006; Weller et al., 2007; Hu et al., 1995; Gomi et al., 2000).

### 3.2.2 Adenosin a jeho imunomodulační vlastnosti

**Adenosin** (Ado) je endogenní purinový nukleosid, který ovlivňuje nejrůznější fyziologické procesy. Chemicky se jedná o 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purin. Je to ubikviterní metabolit, jehož koncentrace se v tkáních a buňkách za normálních podmínek pohybuje v rozmezí 20-200 nM (Fredholm, 2010). Funguje i jako důležitá extracelulární signální molekula, jejíž signální účinky jsou zprostředkovány membránově vázanými adenosinovými receptory (Mundell et Kelly, 2011).

Adenosin, stejně jako PGE<sub>2</sub>, patří mezi klíčové homeostatické regulátory a je považován za významný neuromodulátor (má vliv na neuronální excitabilitu a synaptickou plasticitu). Působením na buňky hladké svaloviny cév vyvolává vazodilataci a tím změny v krevním zásobení, ovlivňuje energetickou homeostázu, inhibuje lipolýzu, zvyšuje odběr glukózy ve svalových a tukových buňkách a má vliv na sekreci inzulínu. V centrální nervové soustavě přímo či nepřímo (přes hormony či transmitery) reguluje cyklus bdění a spánku, příjem potravy a tělesnou teplotu (Fredholm et al., 2011a). Významně se podílí na modulaci imunitního systému a hraje důležitou roli v patogenezi některých neurodegenerativních i jiných závažných onemocnění (Novotný, 2014).

V extracelulárním prostředí vzniká z adenosintrifosfátu (ATP) činností enzymů lokalizovaných v plazmatické membráně nebo je tvořen přímo v buňce, odkud je dopravován přes membránu speciálními přenašeči (Lloyd et Fredholm, 1995).

#### 3.2.2.1 Adenosinové receptory a jejich signální dráhy

Receptory adenosinu označované jako A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub> patří do rodopsinové rodiny (třídy A) receptorů, které jsou spřaženy s trimerními G proteiny (GPCRs), (Katríth et al., 2013) a regulují různé signální dráhy (Sheth et al., 2014; Trincavelli et al., 2010). CD73 a CD39 jsou enzymy, které regulují formaci a degradaci adenosinu *in vivo*. Především enzym CD73 je důležitý pro vývoj adenosinových receptorů (Eltzschig et al., 2004).

Receptory A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> prostřednictvím inhibičních Gi/o proteinů potlačují aktivitu adenylátcyklázy a tvorbu cAMP. Naopak A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> receptory spřažené se stimulačními Gs proteiny vedou ke zvýšení produkce cAMP a stimulaci proteinkinázy A (PKA). Za některých situací se různé podtypy adenosinových receptorů mohou spojovat s G proteiny třídy Gq/11, a ovlivňovat tak fosfolipázu C štěpící fosfatidylinositol-4-5-bifosfát na druhé posly inositol-1,4,5-trifosfát a 1,2-diacylglycerol (Boison et al., 2010; Headrick et al., 2013). Receptory, které jsou spřaženy s Gi/o proteiny, mohou také modulovat funkci napětově



řízených kanálů pro vápenaté nebo draselné kationty, případně prostřednictvím komplexu  $G\beta\gamma$  aktivují fosfatidylinositol-3 kinázu (PI-3K). Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), na jejichž aktivaci se také podílejí adenosinové receptory, jsou aktivovány fosforylací prostřednictvím PKA nebo PI-3K (Schulte et Fredholm, 2003).

Adenosinové receptory se liší nejen svými farmakologickými charakteristikami, ale i svou tkáňovou a buněčnou distribucí. A1 se vyskytuje především v CNS, svalech, játrech, ledvinách a tukové tkáni. A2A receptor zase převážně ve slezině, brzlíku, bílých krvinkách, rovněž v srdci, cévách nebo periferních nervech. A2B receptor je naopak rozšířený v tlustém a slepém střevu, močovém měchýři, plicích, oku a žírných buňkách. A3 receptor převažuje především v žírných buňkách, varlatech a mozku (Sachdeva et Gupta, 2013). Jednotlivé podtypy se liší v afinitě k adenosinu. Receptory A1, A2A vykazují nejvyšší afinitu, k aktivaci za normálních podmínek tedy stačí nízké koncentrace adenosinu. A2B receptor má nižší afinitu, k aktivaci dochází až při zvýšené hladině adenosinu, zejména za stresových situací. A3 receptor vykazuje celkem vysokou afinitu k adenosinu, ale vzhledem k jeho řídkému výskytu, je k jeho aktivaci zapotřebí vyšších koncentrací tohoto agonisty (Fredholm et al., 2011).

### **3.2.2.2 Adenosin a jeho vliv na imunitní systém**

Adenosin je důležitý endogenní zpětnovazebný regulátor zánětlivých procesů a tkáňových poškození. Prostřednictvím svých receptorů významně ovlivňuje rozsah, trvání a vyústění zánětu (Antonioli et al., 2014). Protizánětlivé účinky adenosinu jsou založeny na potlačení aktivace a náboru neutrofilů, na inhibici produkce prozánětlivých cytokinů/chemokinů makrofágy a na současné podpoře tvorby protizánětlivých cytokinů těmito buňkami, ale i na supresi funkce efektorových T lymfocytů (Haskó et Crostein, 2013; Linden et Cekic, 2012).

Regulace makrofágů a T lymfocytů se uskutečňuje hlavně prostřednictvím A2A receptoru, na regulaci funkce neutrofilů se podílí A3 receptor. Receptor A1 zprostředkovává pro/protizánětlivé účinky a A2B receptor stimuluje produkci prozánětlivých mediátorů. Aktivace A3 receptoru může zmírňovat důsledky některých zánětlivých procesů (Antonioli et al., 2014).

### 3.2.2.3 Adenosin a jeho imunomodulační účinky

Adenosin potlačuje TNF- $\alpha$  produkovaného mikroglieami a zvyšuje produkci IL-10 těmito buňkami, zatímco inhibuje produkci dalších prozánětlivých cytokinů (Haskó et Pacher et al., 2012). Receptor A2B je primárně zodpovědný za stimulační účinky adenosinu na produkci IL-10 (Haskó et al., 1996; Csóka et al., 2007; Frick et al., 2009). LPS-indukovaná produkce TNF- $\alpha$  a IL-12 produkovaných mikroglieami je rovněž snížena vlivem adenosinu (van der Putten et al., 2009; Lee JY, 2006). Snižuje i produkci IL-6 aktivovaného různými TLR agonisty. Aktivací dráhy P13K/Akt, uplatňující se v signalizaci adenosinových receptorů, se zvyšuje produkce IL-10 produkovaného makrofágy a DCs (Németh et al., 2003; Borea, 2009).

Adenosin může zeslabit aktivaci T buněčného receptoru aktivováním A2A receptoru a signalizací přes cAMP a PKA. Aktivace PKA může buď zvýšit, nebo inhibovat přežití T buněk, které jsou závislé na délce a době trvání daného signálu. PKA dráha negativně reguluje produkci cytokinů typu 1 (IL-2, IL-12) ve prospěch produkce cytokinů typu 2 (IL-4,-5,-10,-13). Aktivací A2A receptoru se snižuje produkce IL-2, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  směrem od odpovědi Tc1 buněk k vývoji odpovědi Tc2 buněk, ale neovlivňuje sekreci IL-4 nebo IL-5 (Erdman et al., 2005). Aktivace tohoto receptoru rovněž silně inhibuje produkci IFN- $\gamma$  iNKT buňkami (invariantní natural killer T lymfocyt), (Nowak et al., 2010). Studií *in vivo* se prokázalo, že A2A agonista inhibuje produkci IL-6 a zvyšuje produkci IL-10. Nejsilnějším přímým účinkem A2A receptoru stimulujícího lymfocyty je produkce cytokinů typu 1 Th1, Tc1 a iNKT buňkami (Erdman et al., 2005; Nowak et al., 2010).

DCs a makrofágy aktivované LPS v přítomnosti adenosinu vykazují omezenou kapacitu indukovat Th2 subpopulaci naivních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, se sníženým uvolňováním TNF- $\alpha$  a IL-12 a naopak zvýšeným uvolňováním protizánětlivého IL-10 (Németh et al., 2005; Csóka et al., 2007; Haskó et al., 2000). A2B receptory potlačují DCs zprostředkovanou T buněčnou aktivaci, protože stimulací tohoto receptoru se redukuje LPS indukovaná exprese molekul MHCII a CD86, což ve výsledku snižuje expresi IL-2. V nepřítomnosti TLR signalizační stimulace, A2B receptor zvyšuje produkci IL-6, který společně s TGF $\beta$  může odklonit odpověď naivních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů směrem k vývoji Th17 (Wilson et al., 2011). Imunosupresivní aktivitu A2B receptoru na antigen prezentujících buňkách (APC) řídí hypoxie (Yang et al., 2010). Současně také řídí buněčný enzym CD73 na povrchu epitelových a endoteliálních buněk, který štěpí extracelulární AMP na adenosin. (Synnestvedt, 2002).

#### **3.2.2.4 Adenosin a rakovina**

Adenosin představuje klíčový endogenní imunoregulátor v patogenezi některých onemocnění (Kumar, 2013). Doprovodnými jevy nádorového bujení jsou chronické zánětlivé procesy, které společně s hypoxií v tumorech stimulují tvorbu adenosinu. Zvýšené adenosinové hladiny potlačují antineoplastickou aktivitu imunitního systému. Přispívají podporou angiogeneze a remodelace extracelulární matrix k vytváření prostředí vhodného pro zhoubné bujení (Antonioli et al., 2013b).

Svým působením inhibuje adenosin produkci cytokinů Th1 lymfocyty a vyvolává supresi efektorových T lymfocytů. Rovněž potlačuje diferenciaci a maturaci mononukleárních fagocytů. Rakovinné bujení díky tomu uniknou imunitnímu systému (Muller-Haegeler et al., 2014).

A2A a částečně A2B receptory zprostředkují adenosinem indukovanou supresi imunitního systému, čímž podporují růst nádoru. Aktivovaný A3 receptor stimuluje protinádorovou imunitní odpověď a inhibuje proliferaci rakovinných buněk (Montinaro et al., 2013).

V současné době je adenosin zkoumán v souvislosti s problematikou kardiovaskulárních a renálních poruch, hypertenze, chronické obstrukční plicní nemoci, Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby nebo roztroušené sklerózy, rovněž astmatu, alergie, zánětlivých onemocnění a zhoubného bujení (Novotný, 2014).

### 3.3 Adenosin a PGE<sub>2</sub> u hematofágních členovců

Obě látky byly objeveny u mnoha krevsajících členovců. PGE<sub>2</sub> byl objeven u *Ixodes scapularis*, kde je hlavním inhibítozem produkce IL-12 a TNF- $\alpha$  v DCs stimulovaných LPS (Sá-Nunes et al., 2007), u *Dermacentor variabilis* reguluje migraci makrofágů a chemotaxi fibroblastů (Poole et al., 2013). U klíštěte *Amblyomma cajennense* (Carvalho-Costa et al., 2015) PGE<sub>2</sub> inhibuje diferenciaci DCs v kostní dřeni, potlačuje IL 12p40, IL-6 a TNF- $\alpha$ , zatímco současně vyvolává produkci IL-10. Rovněž se ukázalo, že inhibuje expresi CD40 či CD86 u zralých DCs, přičemž vyvolává expresi PD-L1. Ve slinných žlázách *Amblyomma americanum* hlavní funkce PGE<sub>2</sub> spočívá v mobilizaci Ca<sup>2+</sup> a stimulaci sekrece bioaktivních proteinů do slin během sání (Aljamali et al., 2002; Ribeiro et al., 1992; Qian Y et al., 1998). Ve slinách *Aedes aegypti* byla rovněž zjištěna přítomnost PGE<sub>2</sub>, nicméně nebyla potvrzena jeho role v inhibici diferenciaci DCs (Bizzarro B et al., 2013). A u *Ixodes dammini* je přítomností PGE<sub>2</sub> potlačena produkce IL-2 T hybridními buňkami (Ribeiro et al., 1985).

Adenosin byl objeven například u *Phlebotomus argentipes*, u kterého se předpokládalo, že majoritní funkcí Ado je usnadnit krmení. Ukázalo se, že s ostatními nukleotidy je schopen usnadnit přenos leishmanií (parazitární onemocnění), (Ribeiro et al., 2001). U komárů *Culex quinquefasciatus* a *Aedes aegypti* byla zjištěna vysoká hladina enzymu adenosindeaminázy (ADA), který naopak adenosin odbourává. Ukázalo se, že ADA u *Aedes aegypti* odbouráváním adenosinu a produkcí inosinu (inhibitoru zánětlivých cytokinů) přispívá k úspěšnému procesu sání. Jeho role u *Culex quinquefasciatus* zůstává neznámá (Ribeiro et al., 2001).

Obě molekuly současně byly stanoveny ve slinách klíštěte *Rhiphicephalus sanguineus*. U DCs inhibují cytokinovou produkci ovlivněním cAMP-PKA signalizace. Jsou rovněž schopny potlačit expresi kostimulačních molekul CD40 a CD86 u zralých DCs. Bylo prokázáno, že PGE<sub>2</sub> je zároveň jejich diferenciacním inhibítozem v kostní dřeni. Naopak Ado je inhibítozem produkce prozánětlivých cytokinů IL-12p40 a TNF- $\alpha$  a zároveň stimuluje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Oliveira et al., 2011).

Protože ado i PGE<sub>2</sub> jsou neproteinové endogenní malé molekuly, nemůže být na ně přímo zaměřena imunitní reakce hostitele.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Klíštěcí sliny

Sliny byly získány z dospělých samic klíšťat rodu *Ixodes ricinus*, která po dobu 6 dnů sála na morčatech. Částečně nasáté samice byly následně vyňaty z kůže a promyty v 15% etanolu, po oschnutí byly přichyceny na podložní sklíčko oboustrannou lepicí páskou, na hypostom a jednu palpu se jim nasunula skleněná kapilára, která se pomocí modelovací hmoty připevnila na sklíčko a na hřbetní část těla bylo kápnuto 1–2  $\mu\text{l}$  5% roztoku pilocarpinu (5 mg/100  $\mu\text{l}$  čistého etanolu, Sigma Aldrich). Poté byla klíšťata uložena do vlhké komůrky při teplotě 37 °C s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 2,5 h. Po hodině byla klíšťata opět potřena 1  $\mu\text{l}$  pilocarpinu.

Během inkubace docházelo k vylučování slin do kapilár. Vyprodukované sliny byly z kapiláry sesbírány pomocí balonku do mikroskopické pipety a uchovány při teplotě -70 °C. Rozmrazeny byly vždy chvíli před použitím.

Obsah proteinu ve slinách byl určen metodou pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bradford, 1976).

#### 4.1.2 Buněčné linie

Pro pokusy byly použity dvě peritonální makrofágové linie, PMJ-2R a IC-21. Buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C v médiu RPMI obohaceném o 10% bovinního fetálního séra (BOFES), 1 % antibiotik (ATB, penicilin, streptomycin, fungizon), 1 % L-glutaminu (GL) a 0,1 % 2-merkaptoetanolu (ME) (Biosera).

Vzhledem k tomu, že byly buňky pravidelně pasážovány, bylo nutné před každým pokusem provést počítání v Bürkerově komůrce po obarvení trypanovou modří (Sigma Aldrich) v poměru 100:100  $\mu\text{l}$  a dle potřeby buňky centrifugovat nebo přímo odpipetovat do příslušného objemu média.

#### 4.1.3 Standard PGE<sub>2</sub>, inhibitor H-89 a LPS mitogen

V pokusech byl použit standard PGE<sub>2</sub> (Tokyo Industry) pro ověření jeho inhibičních účinků na produkci TNF- $\alpha$  a inhibitor H-89 (inhibitor protein kinázy A, Sigma Aldrich) potlačující inhibiční efekty PGE<sub>2</sub>. Buňky byly k produkci výše zmíněného cytokinu stimulovány LPS (Sigma Aldrich).

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Stanovení obsahu PGE<sub>2</sub> ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*

Pro stanovení PGE<sub>2</sub> byla použita heterogenní kompetitivní ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), kdy neznačený antigen ve vzorku soutěží se standardním množstvím značeného antigenu o vazebné místo na protilátce zakotvené na pevné fázi. Obecně platí, že čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně značeného antigenu se naváže na zakotvenou protilátku. Po přidání enzymového substrátu je výsledná intenzita zabarvení změřena spektrofotometricky (zde při 450 a 540 nm) a pomocí kalibrační křivky ze standardních vzorků jsou odečteny příslušné hodnoty v neznámém vzorku (Budayová, 2004).

PGE<sub>2</sub> přítomný v našich vzorcích klíštěcích slin kompetuje s PGE<sub>2</sub> značeným peroxidázou (HRP) o omezený počet vazebných míst na myší monoklonální protilátce. Během první inkubace se PGE<sub>2</sub> ve vzorku naváže na protilátku. Během druhé inkubace se HRP značený PGE<sub>2</sub> váže na volné paratopy protilátky. Po následném odstranění nenavázaných látek promytím se přidá roztok substrátu k determinaci enzymové aktivity. Intenzita zabarvení změřena Microplate readrem SYNERGY™ H1 (Biotek®) je nepřímo úměrná koncentraci PGE<sub>2</sub> v daném vzorku.

Ke stanovení koncentrace PGE<sub>2</sub> v každém vzorku klíštěcích slin byl použit specifický PGE<sub>2</sub> ELISA kit (R&D Systems).

#### 4.2.1.1 Příprava reagensů a vzorků

Sliny byly získány výše popsaným způsobem, uchovány při -70 °C a rozmrazeny na ledu chvíli před použitím. Klíštěcí sliny bylo nutné zředit, a to 10x (30 µl slin + 270 µl ředícího roztoku) a 20x (15 µl slin + 285 µl ředícího roztoku). Jejich výsledná koncentrace byla vypočítána z kalibrační křivky standardu PGE<sub>2</sub>, který byl rozpuštěn v 1 ml deionizované vody a důkladně promíchán. Poté bylo do mikrozkuřavky napipetováno 40 µl tohoto standardu PGE<sub>2</sub> a doplněno 360 µl ředícího roztoku, čímž bylo dosaženo výchozí koncentrace 2500 pg/ml. Do dalších 6 mikrozkuřavek bylo napipetováno 200 µl ředícího roztoku. Z první mikrozkuřavky o koncentraci PGE<sub>2</sub> 2500 pg/ml bylo přeneseno 200 µl do druhé v řadě, koncentrace se snížila na polovinu, 1250 pg/ml. Postup se opakoval, dokud nebylo dosaženo poslední nejnižší koncentrace 39 pg/ml.

#### 4.2.1.2 Vlastní provedení

Do dvou jamek 96jamkové mikrotitrační destičky bylo přidáno 200  $\mu$ l ředícího roztoku RD5-56 jako NSB (non-specific binding) kontrola. Do jiných dvou jamek bylo napipetováno 150  $\mu$ l ředícího roztoku jako B<sub>0</sub> (zero standard) kontrola. Do jamek určených pro kalibrační křivku bylo nanášeno 150  $\mu$ l připraveného standardu a do 4 jamek 150  $\mu$ l naředěných vzorků (2j/20x zředěné sliny, 2j/10x zředěné sliny). Do všech jamek vyjma NSB bylo následně přidáno 50  $\mu$ l roztoku primární protilátky, což způsobilo modré zabarvení. Následovala hodinová inkubace při laboratorní teplotě na horizontálním microplate shakeru při nastavení 500  $\pm$  50 rpm.

Po hodině bylo do všech jamek napipetováno 50  $\mu$ l PGE<sub>2</sub> konjugátu, které vyvolalo lehce fialové zabarvení. Poté byla destička na třepačce při laboratorní teplotě další dvě hodiny inkubována. Po inkubaci byly všechny jamky 4x důkladně promyty promývacím roztokem (2 ml zásobního roztoku/50 ml deionizované vody) pomocí osmikanálové pipety a důkladně vyklepány. Následně bylo přidáno 200  $\mu$ l substrátového roztoku a po dobu 30 minut byla destička inkubována při laboratorní teplotě na temném místě. Přidáním 100  $\mu$ l stop roztoku byla zastavena enzymatická reakce (žluté zabarvení).

Microplate readem SYNERGY™ H1 (Biotek®) byla během 5 minut změřena absorbance všech vzorků, kontrol a standardu při vlnové délce 450 nm a 540 nm. Detekční limit byl 39 pg/ml.

## 4.2.2 Stanovení obsahu adenosinu u klíštěte *Ixodes ricinus*

Následující stanovení bylo provedeno analytickým chemikem Ing. Davidem Kahounem, Ph. D. na Katedře chemie a biochemie na PřF JU, který na základě metody popsané v publikaci Oliveira et al., 2011 stanovil adenosin v klíštěcích slinách pomocí LC-MS/MS. Rovněž statisticky vyhodnotil přítomnost adenosinu v dodaném vzorku klíštěcích slin.

V kapitole níže je proto popsán pouze princip metody a příprava vzorků.

### 4.2.2.1 Princip LC-MS/MS metody

Výhodou techniky LC-MS/MS je spojení účinné separační techniky kapalinové chromatografie s velmi citlivou a vysoce selektivní detekční metodou tandemové hmotnostní spektrometrie.

Při kapalinové chromatografii dochází k rovnovážné distribuci složek mezi dvě heterogenní fáze – mobilní a stacionární. Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen přes nepohyblivou stacionární fázi, na níž dochází k zachycování složek vzorku. Složky ve vzorku se od sebe separují na základě síly interakce se stacionární fází. Hmotnostní spektrometr převádí molekuly na ionty, jejichž rozlišení probíhá na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Hmotnostní spektrometry mohou být spojeny jako tandemové spektrometry, kdy první ionizace a následné fragmentační reakce generuje ionty, z nichž se vybere požadovaný iont, který se podrobí další fragmentační reakci (kolizní disociaci s plynem) a z něj vzniklé ionty se analyzují.

Výsledkem analýzy jsou dva druhy záznamů – chromatogram a hmotnostní spektrum. Chromatogram je grafický záznam odezvy detektoru na retenčním čase, který poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o separovaných sloučeninách. Kvalitativní vyhodnocení probíhá na základě určení retenčních časů daných analytů. Pro kvantitativní vyhodnocení se využívá plocha píku analytu. Hmotnostní spektrum udává záznam relativních intenzit vzniklých iontů (Klouta P., 2003).

Pro tento pokus byl použit kapalinový chromatograf UltiMate 3000 a hmotnostní spektrometr VelosPro (Thermo).



#### **4.2.2.2 Použité chemikálie a činidla**

Pro zjištění přítomnosti adenosinu ve slinách sloužil standard adenosinu (Sigma Aldrich) a vnitřní standard 2-chloroadenosin (Sigma Aldrich). Pro čistotu LC-MS/MS byl použit acetonitril (Fluca Analytical a Merck) a kyselina mravenčí (Sigma Aldrich).

#### **4.2.2.3 Příprava vzorku klišťecích slin**

Vzorek klišťecích slin (20 µl) byl po dodání ihned skladován při 4 °C v dodané vzorkovnici. Příprava vzorku byla provedena následující den včetně vlastní analýzy.

Do mikrozkuhavky o objemu 1,8 ml bylo odpipetováno 10 µl klišťecích slin, 100 µl precipitačního roztoku a 390 µl acetonitrilu. Roztok byl 15 vteřin míchán na míchačce (Vortex) a odstředěn při 20 000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Poté bylo 450 µl supernatantu převedeno do lahvičky s insertem, roztok byl zahuštěn pod proudem dusíku při 40 °C na objem 10 µl a poté bylo přidáno 100 µl vody. Lahvička byla uzavřena a 15 vteřin promíchána na míchačce (Vortex). Takto připravený vzorek byl ihned analyzován. Vzhledem k nízkému objemu dodaného vzorku klišťecích slin bylo měření provedeno pouze v 1 opakování.

#### **4.2.2.4 Příprava kontrolních vzorků**

Obohacený vzorek (pozitivní kontrola) byl připraven dle předchozí kapitoly s tím rozdílem, že k 10 µl klišťecích slin bylo před přidavkem precipitačního roztoku přidáno ještě 100 µl pracovního roztoku standardu o koncentraci 100 µg/l.

Slepý vzorek (negativní kontrola) byl připraven rovněž stejným způsobem, ale místo 10 µl klišťecích slin bylo do mikrozkuhavky odpipetováno 10 µl acetonitrilu.

### **4.2.3 Vliv PGE<sub>2</sub> a inhibitoru H-89 na produkci TNF- $\alpha$ buněčnou linií IC-21**

Následující pokusy byly provedeny dle práce Oliveira et al., 2011 s jistými modifikacemi uvedenými níže.

Pro tento pokus byla využita makrofágová linie IC-21 stimulovaná LPS, ke které byl přidán PGE<sub>2</sub> a inhibitor H-89. Buňky byly kultivovány v triplikacích a supernatanty odebrány po 4 h.

Produkce cytokinů se stanovila metodou ELISA (heterogenní nekompetitivní enzymoimunoanalýza, tzv. „sandwich“), kde je na pevné fázi navázaná protilátka, která po přidání vzorku vyváže antigen v něm obsažený. Po promytí se na navázaný antigen váže na jinou antigenní determinantu opět protilátka značená enzymem (nejčastěji křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Po opětovném promytí je přidán substrát a následuje enzymatická reakce. Výsledkem je barevný komplex, jehož absorbance je změřena spektrofotometrem. Z hodnot standardních vzorků se sestrojí kalibrační křivka, ze které se odečtou koncentrace daného cytokinu ve vzorku (Budayová, 2004).

#### **4.2.3.1 Příprava buněk a reagensů**

Buňky byly zpasážovány dva dny před pokusem a naředěny do kultivačního média do koncentrace  $2 \times 10^5$ /ml.

Poté byl k buňkám přidán PGE<sub>2</sub>, H-89 a LPS. Všechny reagensy byly ředěny v RPMI médiu.

#### **4.2.3.2 Inhibice TNF- $\alpha$ pomocí PGE<sub>2</sub> a její ovlivnění H-89**

Do 9 jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200  $\mu$ l již připravené buněčné suspenze. Pouze do 6 jamek byly přidány 2  $\mu$ l PGE<sub>2</sub> o konečné koncentraci 1  $\mu$ M. Do 3 jamek s PGE<sub>2</sub> bylo rovněž přidáno 10  $\mu$ l inhibitoru H-89 o konečné koncentraci 5  $\mu$ M. Buňky byly preinkubovány po dobu 30 minut v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C. Poté byly do všech jamek napipetovány 2  $\mu$ l LPS, aby jeho konečná koncentrace byla 500 ng/ml. Buňky byly znovu umístěny do inkubátoru po dobu 4 h.

Po 4h inkubaci s 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C bylo z každé jamky odebráno 100  $\mu$ l vzorku. Protože vzorky nebyly ihned použity, byly uchovány v mrazicím boxu při -20 °C.

#### **4.2.3.3 Měření produkce TNF- $\alpha$**

Analýza byla provedena dle pokynů výrobce kitu pro TNF- $\alpha$  (Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience) s těmito modifikacemi: pouze 50  $\mu$ l reagensí (protilátek, avidinu HRP, standardu a vzorků), četnější promývání a po přidání TMB substrátového roztoku (vyvolání změny zbarvení) byla reakce zastavena, až když byla barva středně sytá (většinou podle prvního bodu kalibrace).

Microplate readem SYNERGY<sup>TM</sup> H1 (Biotek<sup>®</sup>) byly změřeny hladiny TNF- $\alpha$  při 450 nm a pomocí rovnice kalibrační křivky byly vypočítány koncentrace TNF- $\alpha$  pro všechny triplety.

#### **4.2.4 Vliv PGE<sub>2</sub> a inhibitoru H-89 na produkci TNF- $\alpha$ makrofágovými liniemi IC-21 a PMJ-2R (modifikace postupu)**

Provedení pokusu bylo totožné s výše popsáním pokusem (viz kapitola 4.2.3) s tím rozdílem, že byl přidán triplet vzorku označeného jako LPS + H89 a byly použity obě makrofágové linie.

Buňky byly použity v koncentraci  $2 \times 10^5$ /ml.

Reagencie (PGE<sub>2</sub>, H-89 a LPS) byly rovněž přidány ve stejném objemu a dané koncentraci. Ovšem tentokrát byl k buňkám přidán nejprve inhibitor H-89. Po 45 minutové inkubaci byl napipetován do příslušných jamek PGE<sub>2</sub>. A po další 30 minutové inkubaci byl přidán LPS.

Pokus byl proveden opět v triplikacích a vzorky byly odebrány po 4 i 24 h.

#### **4.2.5 Vliv PGE<sub>2</sub>, inhibitoru H-89 a klíštěcích slin na produkci TNF- $\alpha$ makrofágovými liniemi**

Pro tento pokus byly použity rovněž obě makrofágové linie, PMJ-2R a IC-21. I postup byl totožný s předcházejícím pokusem (viz kapitola 4.2.4). Byly ovšem přidány další dva triplety vzorků obsahující klíštěcí sliny, u kterých bylo nutné stanovit obsah proteinu.

Reagencie byly rovněž přidávány ve stejném objemu a ve stejné konečné koncentraci (viz 4.2.3). Buňky byly kultivovány v triplikacích a odebrány po 4 h a 24 h vyjma triplikátů buněk IC-21, jejich vzorky byly odebrány jen po 24 h.

Ke stanovení TNF byla použita ELISA se stejnými modifikacemi (viz kapitola 4.2.3.)

##### **4.2.5.1 Stanovení proteinu v klíštěcích slinách**

Obsah proteinu ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* byl stanoven metodou dle Bradfordové. Do 100  $\mu$ l činidla se přidalo 10  $\mu$ l BSA standardu (b**o**vinní s**é**rový albumin) o koncentraci 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 a 700 ng/ml. Při 594 nm byla změřena absorbance a pomocí kalibrační rovnice byla vypočítána koncentrace proteinu ve slinách, která činila 216  $\mu$ g/ml.

#### 4.2.6 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programech MS Excel (Microsoft Corporation, USA) a Statistica 12 (Statsoft, USA).

Pro vytvoření databázi dat a deskriptivní statistiku byl využit program MS Excel, ve kterém byly zároveň tvořeny všechny grafy. Konfirmační statistika byla provedena v softwaru Statistika 12. Na data získaná z ELISA testu byla využita metoda mnohanásobné lineární regrese, jejímž výsledkem byl lineární model – kalibrační křivka. Všechny získané křivky dosáhly hladiny významnosti  $p < 0,05$  a koeficientu spolehlivosti  $R > 0,9000$ .

Data získaná z experimentálních vzorků byla vyhodnocena Studentovým t-testem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (\* pro  $p < 0,05$ , \*\* pro  $p < 0,01$ ). Všechny grafy použité ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry z naměřených dat a chybové úsečky v grafech znázorňují střední chybu průměru (SEM).

Vyhodnocení naměřených dat z metody LC-MS/MS bylo provedeno pomocí programů Chromeleon, Tune plus, Xcalibur a DC MS Link. Zpracování výsledků bylo provedeno v programu MS Excel a Effivaldation 3.0.

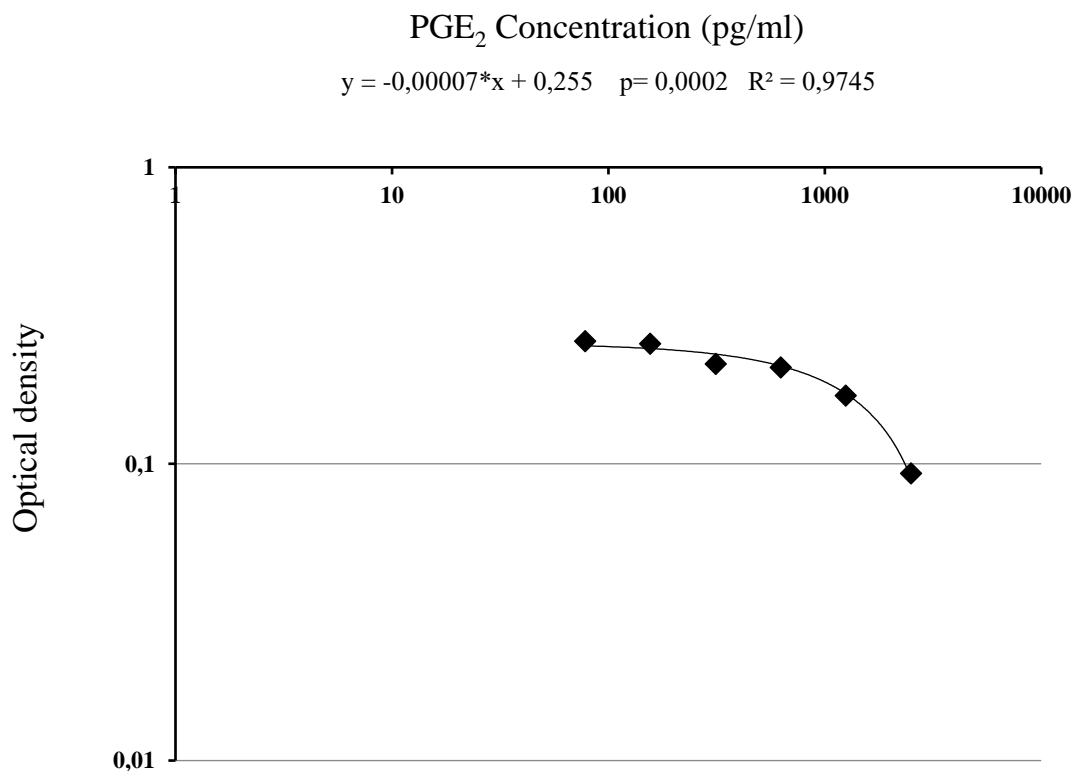
Vyhodnocení ELISA testu specifického pro PGE<sub>2</sub> bylo rovněž provedeno v programu Statistica 12 a MS Excel za použití lineárního modelování dle návodu obsaženém v kitu R&D Systems.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení obsahu PGE<sub>2</sub> v klíštěcích slinách

Cílem prvního pokusu bylo zjistit, zda sliny klíštěte *Ixodes ricinus* obsahují neproteinovou látku prostaglandin E<sub>2</sub>.

Pro kvantitativní stanovení PGE<sub>2</sub> byl použit specifický druh ELISA testu (kit R&D Systems). Spektrofotometrem bylo provedeno vyhodnocení při vlnové délce 450 nm a 540 nm. Výsledná absorbance byla rovna průměru naměřených hodnot, od kterých byla odečtena hodnota NSB kontroly. Kalibrační křivka byla sestrojena z kalibračních hladin v rozmezí 78 - 2500 pg/ml, přičemž každá hodnota koncentrace byla zlogaritmována. Rovnice získaná z kalibrační křivky (viz Obr. 1) byla  $y = (-0,00007 * x) + 0,255$  s hodnotou koeficientu spolehlivosti  $R = 0,9745$  (kritérium přijatelnosti  $R > 0,9000$ ) a hladinou významnosti  $p = 0,0002$  (kritérium přijatelnosti  $p < 0,05$ ). Protože kalibrační křivka splnila obě kritéria přijatelnosti, lze ji považovat za významnou.



Obr. 1: Kalibrační křivka pro PGE<sub>2</sub>.

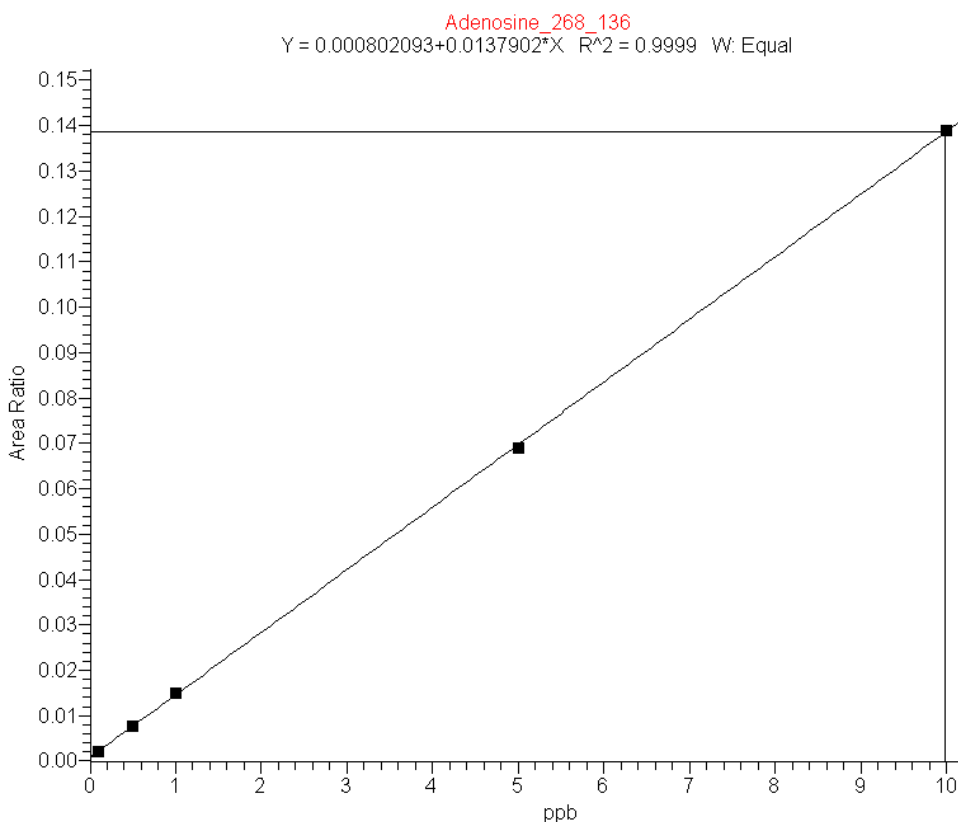
Pro každý vzorek klíštěcích slin, jejichž absorbance byly rovněž zprůměrovány a byla odečtena hodnota NSB, byly vypočítány jednotlivé koncentrace PGE<sub>2</sub>. Konečné koncentrace byly vynásobeny příslušným faktorem ředění.

Sliny 10x zředěné obsahovaly 6000 a 7857 pg/ml PGE<sub>2</sub>. Naopak 20x zředěné sliny obsahovaly 2571 a 12142 pg/ml. Po zprůměrování všech hodnot byla konečná koncentrace PGE<sub>2</sub> ve slinách *I. ricinus* rovna 7143 pg/ml (7,1 ng/ml).

## 5.2 Stanovení obsahu adenosinu v klišťecích slinách

Cílem tohoto experimentu bylo stanovit přítomnost druhé nízkomolekulární látky, adenosinu.

Pro kvantitativní stanovení obsahu adenosinu v klišťecích slinách byla použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Kalibrační křivka byla sestrojena na 5 kalibračních úrovních (0,1 – 10 µg/l), přičemž každá koncentrační úroveň byla změřena v 1 opakování. Rovnice získaná z kalibrační křivky (viz Obr. 2) činila  $y = 0,000802093 + 0,0137902 \cdot x$  s hodnotou koeficientu spolehlivosti  $R = 0,9992$  (kritérium přijatelnosti  $R > 0,9900$ ) a hodnotou koeficientu kvality  $QC = 4,60 \%$  (kritérium přijatelnosti  $QC < 5,00$ ). Vzhledem ke splnění obou kritérií přijatelnosti kladených na rovnice kalibračních křivek používaných pro kvantitativní analýzu, mohla být tato kalibrační křivka použita pro zamýšlený účel.



Obr. 2: Kalibrační křivka adenosinu.

Výsledek analýzy vzorku klišťecích slin byl naprosto srovnatelný s výsledkem slepého vzorku (negativní kontrola), který byl na úrovni meze detekce metody (3 pg adenosinu na 1 µl klišťecích slin) a pod mezí kvantifikace metody (5 pg adenosinu na 1 µl



klíštěcích slin). Hodnota obsahu adenosinu v klíštěcích slinách byla tedy pod mezí detekce metody, činila  $< 3$  pg adenosinu na  $1 \mu\text{l}$  klíštěcích slin. Výsledek analýzy obohaceného vzorku (pozitivní kontrola) poskytl odchylku pouze  $-1 \%$ , čímž bylo prokázáno, že metoda poskytla správné výsledky.

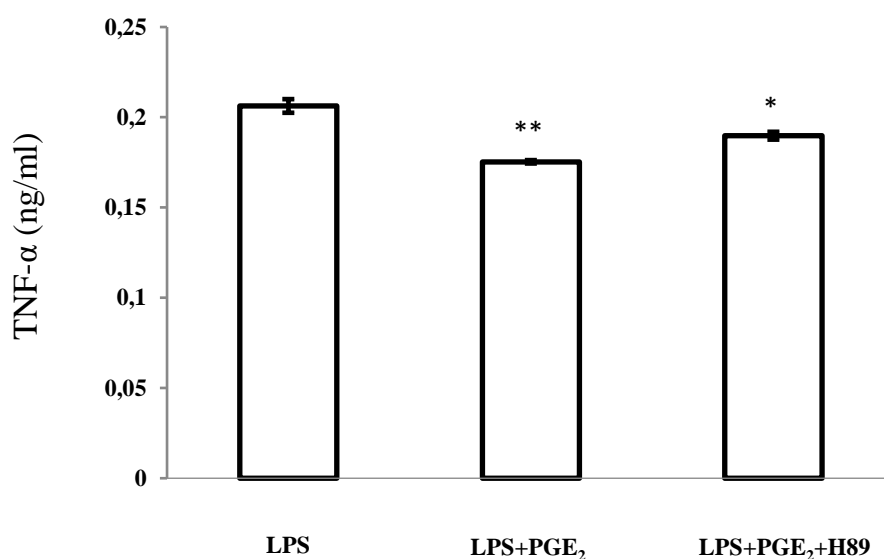
### 5.3 Vliv PGE<sub>2</sub> a H-89 na produkci cytokinu TNF- $\alpha$

Cílem pokusu bylo stimulovat makrofágové buňky PMJ-2R a IC-21 k produkci TNF  $\alpha$  a určit vliv PGE<sub>2</sub> a inhibitoru H-89 na jeho produkci.

Před provedením hlavního pokusu s klišťecími slinami obsahujícími PGE<sub>2</sub> bylo nejprve ověřeno, zda standardní 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> je schopen inhibovat produkci TNF- $\alpha$  a zdali 5  $\mu$ M inhibitor H-89 dovede zpětně potlačit efekt PGE<sub>2</sub>, čímž dojde ke zvýšení hladiny TNF- $\alpha$ . Produkce cytokinu byla indukována LPS o konečné koncentraci 500 ng/ml.

Inhibitor sám o sobě nemá buňky nijak modifikovat. Pokud byl triplikát LPS + H89 negativní (produkce cytokinu neovlivněna), nebylo v grafu nic poznamenáno.

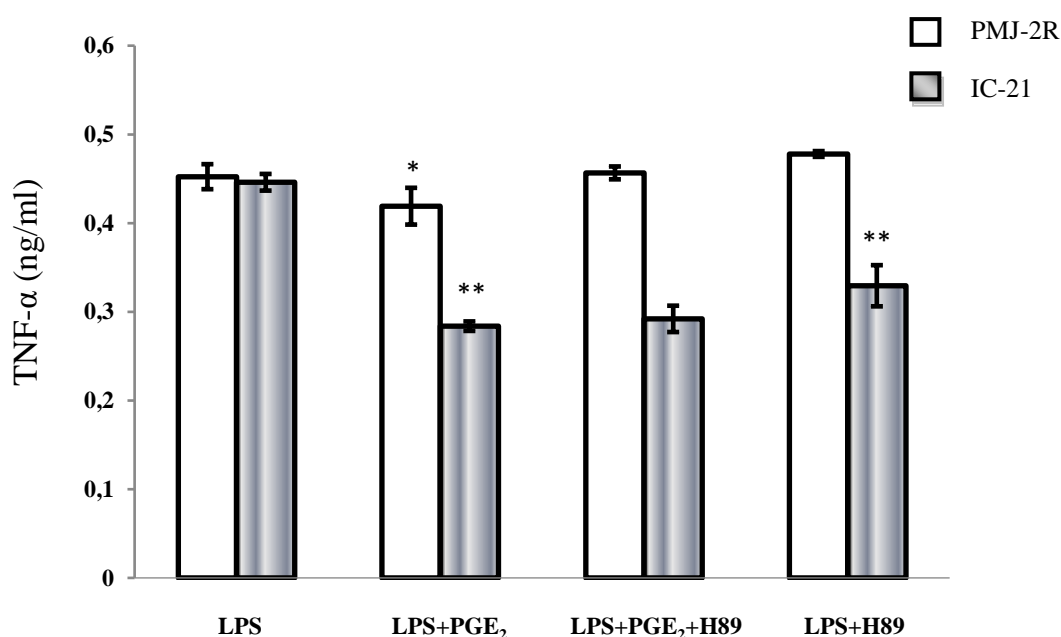
Nejdříve byla použita buněčná linie IC-21 (Obr. 3). Produkce TNF- $\alpha$  v přítomnosti PGE<sub>2</sub> byla o 15 % snížena, zatímco inhibitor H-89 potlačil PGE<sub>2</sub> efekt a došlo k zpětnému zvýšení hladiny téměř o 8 %.



Obr. 3: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií IC-21 po 4h inkubaci.

LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\*  $p < 0,01$ ; LPS + PGE<sub>2</sub> vs. LPS + PGE<sub>2</sub> + H89 \*  $p < 0,05$ .

Podobný trend byl pozorován i v dalším pokuse při stanovení produkce TNF- $\alpha$  oběma makrofágovými liniemi IC-21 a PMJ-2R (Obr. 4). Po 4 h byl u buněk PMJ-2R ověřen inhibiční efekt PGE<sub>2</sub> (snížení až o 12 %), který byl však významný pouze v porovnání s triplikátem LPS + H89 díky menší variabilitě hodnot oproti LPS. Účinek H-89 na toto potlačení z důvodu variability v rámci triplikací nebyl u PMJ-2R linie statisticky významný. U buněk IC-21 PGE<sub>2</sub> snížil hladinu TNF- $\alpha$  o 46 %. Přestože lze v grafu vyčíst patrný rozdíl, nebyl prokázán signifikantní efekt inhibitoru H-89 ani u těchto buněk ze stejných důvodů uvedených výše.

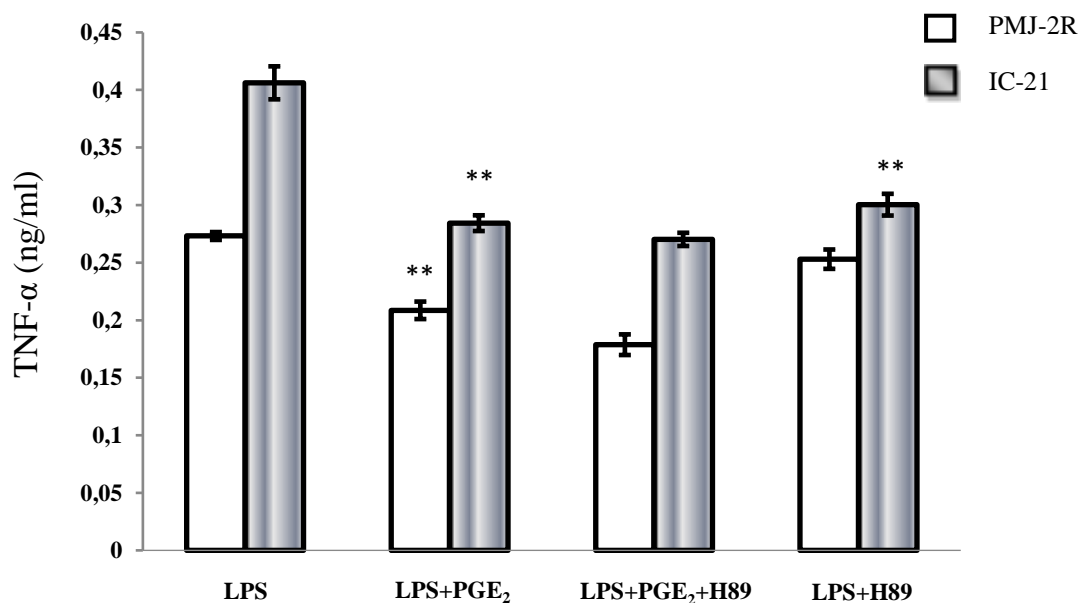


Obr. 4: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií PMJ-2R a IC-21 po 4 h.

PMJ-2R: LPS + PGE<sub>2</sub> vs. LPS + H89 \*  $p < 0,05$ .

IC-21: LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\*  $p < 0,01$ ; LPS vs. LPS + H89 \*\*  $p < 0,01$ .

Vzorky odebrané po 24 h (Obr. 5) ukázaly, že inhibitor H-89 zřejmě ztratil svůj inhibiční účinek na PGE<sub>2</sub> u obou buněčných linií. Pokles koncentrace cytokinu byl opět výrazný v triplikátech s PGE<sub>2</sub> (24 %, 30 %). U buněk IC-21 byl ovšem zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci cytokinu mezi LPS a LPS + H89 v obou odběrech. Rovněž je patrné, že buňky IC-21 po 24 h vykazovaly vyšší produktivitu TNF- $\alpha$ .



Obr. 5: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií PMJ-2R a IC-21 po 24h inkubaci.

PMJ-2R: LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\* p < 0,01.

IC-21: LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\* p < 0,01; LPS vs. LPS + H89 \*\* p < 0,01.

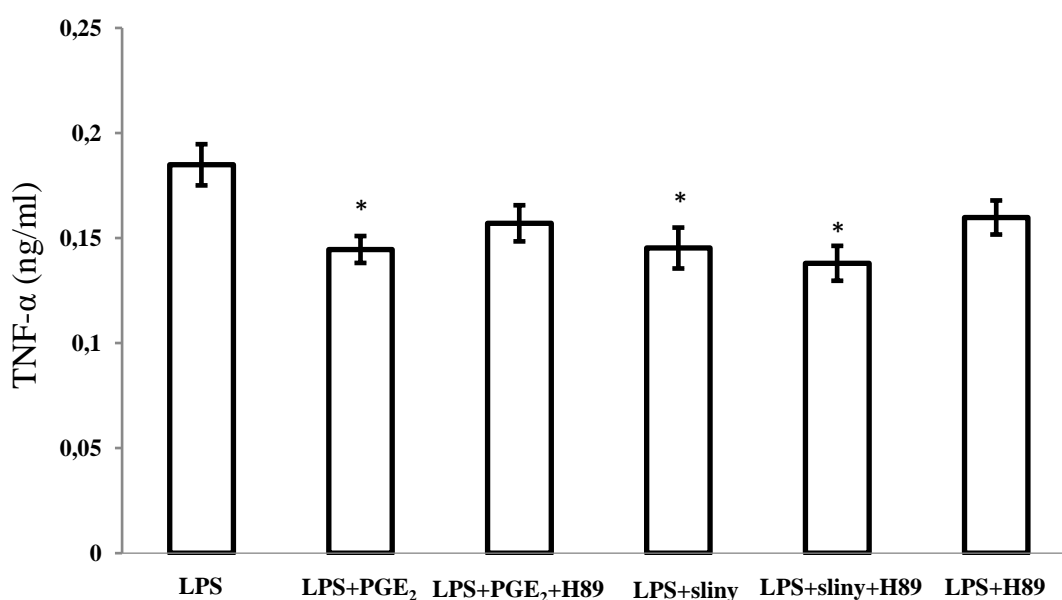
## 5.4 Vliv PGE<sub>2</sub>, H-89 a klíštěcích slin na produkci cytokinu TNF- $\alpha$

Účelem tohoto experimentu bylo zhodnotit úlohu prostaglandinu E<sub>2</sub> prokazaného ve sklinách klíštěte *I. ricinus*. Pro pokus byly rovněž vybrány obě linie buněk s tím rozdílem, že triplikace vzorků IC-21 byly odebrány pouze po 24 h kvůli triplikátu LPS + H89 (viz 5.3). Do každé jamky bylo přidáno vždy 10  $\mu$ l klíštěcích slin, aby byla výsledná koncentrace proteinu 10  $\mu$ g/ml.

Na obr. 6 je výsledek pokusu s klíštěcími slinami u PMJ-2R buněčné linie. Po 4 h byla rovněž jako v předchozím experimentu výrazná inhibice produkce TNF- $\alpha$  vyvolaná PGE<sub>2</sub> (o 20 %). Inhibitor H-89 potlačil účinek PGE<sub>2</sub>, a zvýšil tak produkci TNF- $\alpha$  téměř o 8 %. Bohužel ani zde nebyl efekt inhibitoru H-89 statisticky významný.

Signifikantní snížení produkce TNF- $\alpha$  (o 22 %) bylo vyvolané klíštěcími slinami. V porovnání s PGE<sub>2</sub> je zřejmé, že sliny vykazovaly silnější inhibiční účinek.

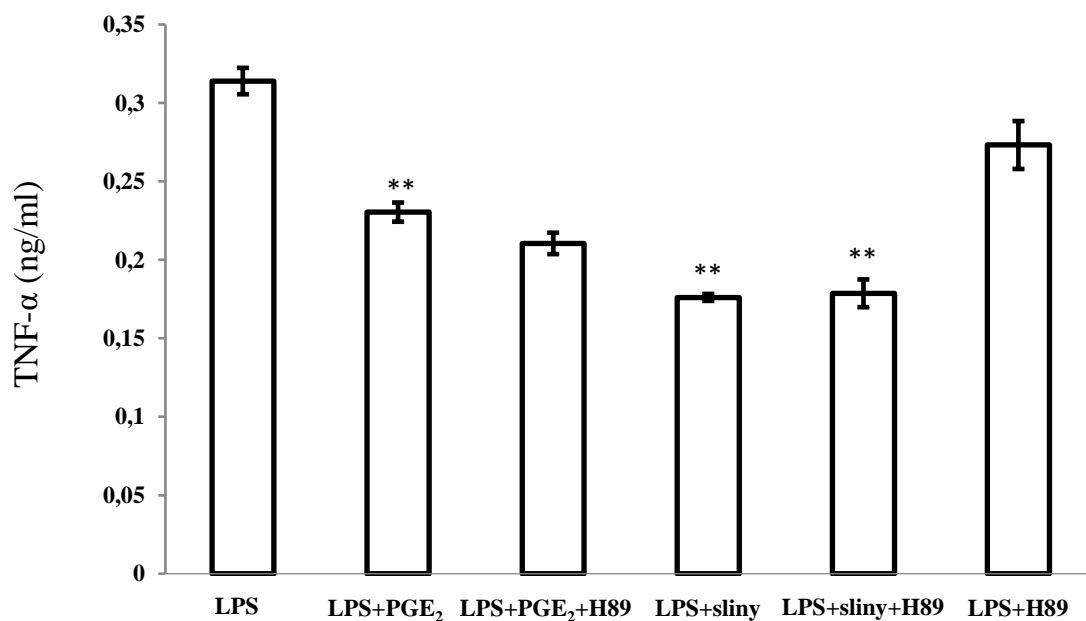
Zatímco H-89 ovlivňoval inhibiční vlastnosti PGE<sub>2</sub>, byť statisticky nevýznamně, v přítomnosti klíštěcích slin obsahujících vlastní PGE<sub>2</sub> nebyl prokázán jeho účinek po 4 h, ani 24 h v žádném z pokusů. Samotný H-89 neovlivňoval buňky v cytokinové produkci.



Obr. 6: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií PMJ-2R po 4h inkubaci.

LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*  $p < 0,05$ ; LPS vs. LPS + sliny \*  $p < 0,05$ ; LPS vs. LPS + sliny +H89 \*  $p < 0,05$ .

I po 24h byla statisticky prokázána inhibice cytokinu TNF- $\alpha$  prostaglandinem E<sub>2</sub> (o 26 %) a potlačení klíštěcími slinami bylo rovněž signifikantní (o 42 %). Klíštěcí sliny v porovnání s PGE<sub>2</sub>, podobně jako v předchozím pokusu, silněji inhibovaly produkci cytokinu. Nicméně PKA inhibitor H-89 opět neinhiboval účinek klíštěcích slin, ani samotný PGE<sub>2</sub>, který tak nadále snižoval produkci TNF- $\alpha$ . Bylo však potvrzeno, že H-89 neměl na buňkami produkovaný cytokin vliv.



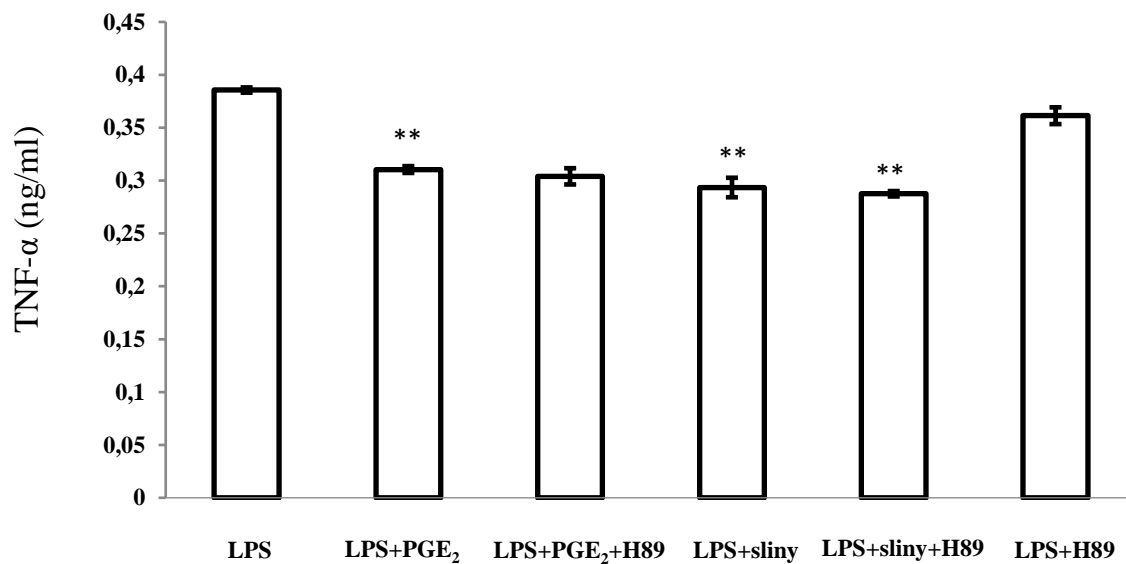
Obr. 7: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií PMJ-2R po 24h inkubaci.

LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\* p < 0,01; LPS vs. LPS + sliny \*\* p < 0,01; LPS vs. LPS + sliny + H89 \*\* p < 0,01.

Experiment byl proveden i s buněčnou linií IC-21 (Obr. 8), aby bylo ověřeno, že inhibitor H-89 opravdu nevykazuje po 24 h inhibiční účinky na PGE<sub>2</sub>. Dalším důvodem byla triplikace vzorku LPS + H89, která v předchozích pokusech u stejných buněk vykazovala signifikantní rozdíly v produkci cytokinu oproti LPS.

PGE<sub>2</sub> významně snížil cytokinovou produkci o 20 %, zatímco inhibitor H-89 jeho účinky nezvrátil. Klíštěcí sliny rovněž vykazovaly signifikantní snížení produkce TNF- $\alpha$  (o 23 %), avšak inhibitor H-89 neblokoval jejich inhibiční efekt. PGE<sub>2</sub> v porovnání s klíštěcími slinami rovněž vykazoval slabší účinek v inhibici TNF- $\alpha$ . Podařilo se ovšem

prokázat, že samotný H-89 neovlivňoval produkci TNF- $\alpha$  ani u této buněčné linie, nebyla zaznamenána signifikance.



Obr. 8: Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií IC-21 po 24h inkubaci.

LPS vs. LPS + PGE<sub>2</sub> \*\* p < 0,01; LPS vs. LPS + sliny \*\* p < 0,01; LPS vs. LPS + sliny + H89 \*\* p < 0,01.

## 6 DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda sliny klíštěte *Ixodes ricinus* obsahují nízkomolekulární látky neproteinového charakteru, prostaglandin E<sub>2</sub> a adenosin, které významně ovlivňují imunitní odpověď hostitele a hodnotit jejich úlohu v supresi produkce cytokinu TNF- $\alpha$  makrofágy pomocí inhibitoru H-89.

Použitím specifického PGE<sub>2</sub> ELISA testu se podařilo prokázat, že klíštěcí sliny *I. ricinus* obsahují prostaglandin E<sub>2</sub> (7 ng/ml). Tato velmi nízká koncentrace naznačuje, že PGE<sub>2</sub> není hlavní nebo významnou molekulou s imunomodulačními účinky ve slinách *I. ricinus*. Lze to doložit porovnáním koncentrací PGE<sub>2</sub> u jiných klíšťat. Například u *Dermacentor variabilis* (352 ng/ml, Poole et al., 2013), *Amblyomma americanum* (469 ng/ml, Ribeiro et al., 1992) nebo u *I. scapularis* (505 ng/ml, Sá-Nunes, et al., 2007) je koncentrace PGE<sub>2</sub> daleko vyšší. Ve slinách klíštěte *R. sanguineus* (Oliveira et al., 2011) je naopak nízká koncentrace PGE<sub>2</sub> (100 nM) kompenzována přítomností adenosinu a jejich vzájemnou spoluprací. Velmi nízká koncentrace PGE<sub>2</sub> u *I. ricinus* nemůže být nikterak kompenzována, neboť adenosin nebyl ve slinách prokázán vůbec. Obsah adenosinu byl stanoven pod mezí detekce metody LC-MS/MS, která činila < 3 pg adenosinu na 1  $\mu$ l klíštěcích slin.

Po zjištění, že sliny *I. ricinus* obsahují pouze PGE<sub>2</sub>, jsme provedli pokusy s klíštěcími slinami, abychom určili, zda i toto nízké množství PGE<sub>2</sub> je schopno inhibice produkce cytokinů. Je známo, že PGE<sub>2</sub> i Ado modulují produkci cytokinů přes cAMP signalizační dráhu. Selektivní PKA inhibitor H-89 hraje důležitou roli v modulaci produkce cytokinů ovlivněné adenosinem i PGE<sub>2</sub> (Haskó et Cronstein, 2004). Abychom určili, jestli je PGE<sub>2</sub> silnějším imunomodulátorem než dosud identifikované proteiny ve slinách, použili jsme k blokaci jeho účinku právě inhibitor H-89.

V experimentech byly použity dvě různé makrofágové buněčné linie, PMJ-2R a IC-21. Makrofágy jsou klíčovým regulátorem zánětlivých a imunitních reakcí. Podstatné je, že spouští proliferační fázi hojení sekrecí cytokinů a růstových faktorů. Cytokiny ovládají zánětlivé a buněčné imunitní odpovědi tím, že ovlivňují aktivace a funkce T lymfocytů (Werner et al., 2003). Je známo, že tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) je pleotropní cytokin syntetizovaný různými buňkami, obzvláště mononukleárními fagocyty. Jeho syntéza je nejčastěji stimulována lipopolysacharidem (LPS), který byl použit i v této práci. Takto stimulované makrofágy jsou majoritním zdrojem TNF- $\alpha$ , a jsou tak nejpoužívanějším



modelem produkce tohoto cytokinu (Beutler, 1995). Zatímco LPS indukuje produkci TNF- $\alpha$ , prostaglandin E<sub>2</sub> potlačuje LPS dependentní TNF- $\alpha$  produkci jak na transkripční, tak posttranskripční úrovni (Kunkel et al., 1988).

Ve slinách různých druhů klíšťat byly objeveny molekuly zodpovědné za supresi produkce cytokinu TNF- $\alpha$ . U klíštěte *I. scapularis* je to protein SALP 15 (Anguita et al., 2002) nebo SialoL (Kotsyfakis et al., 2006, 2007), u *I. ricinus* se jedná o protein Iris (Leboulle et al., 2002; Prevot et al., 2009). Mezi další takové proteiny patří hyalomin A a B u klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Wu et al., 2010), protein japanin ze slin klíštěte *Rhiphicephalus appendiculatus* (Preston et al., 2013) a protein Da-p36 u *Dermacentor andersoni* (Bergman et al., 2000). U klíštěte *R. sanguineus* snižují produkci TNF- $\alpha$  neproteinové látky PGE<sub>2</sub> a Ado (Oliveira et al., 2011). Ve slinách *Amblyomma cajennense* je za supresi zodpovědný jen PGE<sub>2</sub> (Carvalho-Costa et al., 2015), rovněž i u klíštěte *I. scapularis* (Sá-Nunes et al., 2007).

Prostřednictvím pokusů bylo nejdříve ověřeno, zda inhibitor H-89 (5  $\mu$ M) opravdu blokuje účinek PGE<sub>2</sub> na produkci TNF- $\alpha$ . Pro tento účel byla zvolena standardní 1  $\mu$ M koncentrace PGE<sub>2</sub>. U buněčné linie IC-21 bylo prokázáno, že PGE<sub>2</sub> po 4 h signifikantně snížil produkci TNF- $\alpha$  o 15 %. Rovněž inhibitor H-89 významně, ale nikoli úplně, potlačil účinek PGE<sub>2</sub>, čímž došlo k navýšení produkce TNF- $\alpha$  o 8 %. U obou buněčných linií v dalších pokusech byl rovněž prokázán inhibiční účinek PGE<sub>2</sub> na produkci TNF- $\alpha$ . Naneštěstí z důvodů velké variability v rámci triplikace již nebyla prokázána statistická významnost účinku inhibitoru H-89. Nicméně v grafech jsou viditelné rozdíly, které by byly jinak prokazatelné, pokud by se zajistila menší variabilita. Zároveň bylo prokázáno, že samotný inhibitor H-89 buňky žádným způsobem neovlivňoval. Produkce cytokinu buňkami stimulovanými LPS s H-89 byla srovnatelná s produkcí cytokinu buňkami bez H-89. U buněk IC-21 musel být však pokus zopakován, protože se zdálo, že H-89 snižuje produkci cytokinu. Nakonec se však ukázalo, že i u linie IC-21 inhibitor PKA H-89 neovlivňuje jeho tvorbu. Dále jsme zjistili, že i po 24 h je PGE<sub>2</sub> schopen inhibice TNF- $\alpha$ . Totéž ovšem neplatilo u H-89, neboť v žádném z pokusů nebylo prokázáno, že by po 24 hodinách blokoval účinky PGE<sub>2</sub>.

V další části experimentování jsme se zaměřili na funkci PGE<sub>2</sub> v klíštěcích slinách *I. ricinus*. U slin tohoto klíštěte byly potvrzeny četné imunomodulační účinky ovlivňující jak přirozenou, tak i specifickou imunitu hostitele (Kotál et al., 2015).

Podařilo se nám potvrdit, že klíštěcí sliny vykazují silný inhibiční efekt na produkci prozánětlivého cytokinu. Sliny inhibovaly produkci TNF- $\alpha$  o 20 - 45 % jak po 4 h, tak i po 24 h, podstatně silněji než standardní 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>. Můžeme tedy tvrdit, že PGE<sub>2</sub> přítomný ve slinách *I. ricinus* o koncentraci 7 ng/ml není hlavním iniciátorem inhibice TNF- $\alpha$ , protože koncentrace PGE<sub>2</sub> ve slinách byla 10x nižší než námi použitá koncentrace PGE<sub>2</sub> standardu. Potvrzuje to i fakt, že inhibitor H-89 s velkou pravděpodobností blokoval klíštěcí PGE<sub>2</sub>, ovšem kvůli jeho nízké koncentraci nebyla tato inhibice dostačující, a sliny tak dál mohly potlačovat produkci cytokinu TNF- $\alpha$  pomocí jiných látek se silnějšími imunomodulačními vlastnostmi.

PGE<sub>2</sub> i adenosin byly předmětem zájmu několika studií. V práci Sá-Nunes et al., (2007) demonstrovali inhibiční účinek slin *Ixodes scapularis* (PGE<sub>2</sub> o koncentraci 505 ng/ml) na produkci IL-12 a TNF- $\alpha$  a současně zvýšení produkce IL-10 DCs stimulovanými TLR ligandy. DCs preinkubovali s 10 nM PGE<sub>2</sub> po dobu 30 minut a poté přidali LPS (100 ng/ml). Přes noc byla produkce TNF- $\alpha$  snížena na 1/5. Navrhli, že blokace produkce cytokinů těmito prostanoidy, může přispívat k protizánětlivým a imunosupresivním účinkům slin *in vivo*. Je to potvrzeno i faktem, že inhibice produkce cytokinů DCs nebo makrofágy bylo dosaženo pozoruhodně nízkými dávkami PGE<sub>2</sub> (Nataraj et al., 2001). Sliny zvyšují produkci IL-10, protizánětlivého cytokinu, jehož exprese je modulována též PGE<sub>2</sub> (Harizi et al., 2002). IL-10 slouží rovněž jako účinný mechanismus k omezení maturace DCs a jejich schopnosti iniciovat Th1 odpověď (Banchereau et al., 1988). Je možné předpokládat, že sliny inhibují záněty a oslabují Th1 odpověď, protože maturace a diferenciací Th1 buněk je závislá především na IL-12 a TNF- $\alpha$ , jejichž produkce byla vlivem PGE<sub>2</sub> inhibována.

Poole et al., (2013) ve své práci demonstrovali vliv PGE<sub>2</sub> (352 ng/ml) ve slinách *Dermacentor variabilis* na regulaci migrace makrofágů a fibroblastů, spolu se sekrecí cytokinů produkovaných makrofágy využitím 10  $\mu$ M receptorového antagonisty PGE<sub>2</sub>AH 6809. Sliny *D. variabilis*, podobně jako jiných klíšťat rodu *Ixodes*, obsahují vysoké koncentrace PGE<sub>2</sub> a indukují sekreci PGE<sub>2</sub> samotnými makrofágy. Treffkorn et al., (2004) studovali účinek PGE<sub>2</sub> na produkci cytokinů TNF- $\alpha$ , ET-1, IL-1 $\alpha$ , IL-6 a IL-10 v krysích jaterních makrofágách stimulovaných LPS. PGE<sub>2</sub> inhiboval syntézu fibrogenických mediátorů TNF- $\alpha$ , ET-1 a IL-1 $\alpha$ , a současně zvyšoval uvolnění anti-fibrogenických mediátorů IL-6 a IL-10. Kim et al., (2000) ukázali, že interferon gama (IFN- $\gamma$ ) inhibuje

supresivní účinky PGE<sub>2</sub> na produkci TNF- $\alpha$  myšími makrofágy. Je známo, že IFN- $\gamma$  je produktem aktivovaných T lymfocytů a je důležitým aktivátorem makrofágů. IFN- $\gamma$  může snížit hladiny LPS požadované k plné aktivaci monocytů a makrofágů. Kim et al., (2000) rovněž ukázali, že IFN- $\gamma$  (100 U/ml) zvyšuje produkci LPS indukovaného TNF- $\alpha$ , zatímco sám o sobě neindukuje produkci biologicky aktivního TNF- $\alpha$  v makrofágách (Narumi et al., 1990). U PGE<sub>2</sub> se prokázalo, že redukuje LPS indukovaný TNF- $\alpha$ . Nicméně u makrofágů ošetřených IFN- $\gamma$  se prokázala snížená reakce k supresivním účinkům PGE<sub>2</sub>. Makrofágy, které byly ošetřeny IFN- $\gamma$  před přidáním LPS a PGE<sub>2</sub>, zcela překonaly jeho účinky na produkci TNF- $\alpha$ . Čím delší byla doba preinkubace, tím byly makrofágy více rezistentní k jakkoli vysokým koncentracím PGE<sub>2</sub>, a produkce TNF- $\alpha$  se tím výrazně zvýšila. Tato data naznačují, že efekt byl zprostředkovaný schopností IFN- $\gamma$  potlačit inhibiční účinky PGE<sub>2</sub> (Kim et al., 2000).

Aljamali et al., (2002) stanovili obsah PGE<sub>2</sub> ve slinách klíštěte *Amblyomma americanum* (2830 ng/ml) pomocí radioimunoanalýzy a GC/MS metody. Zajímavým objevem této práce bylo, že během krmení se zvýšila hladina PGE<sub>2</sub> z 0,2 ng/ml na 80 ng/pár slinných žláz. Tento nárůst může být způsoben buď pozoruhodnou schopností slinných žláz shromáždit PGE<sub>2</sub> z ostatních tkání během sání nebo syntézou de novo. Carvalho-Costa et al., (2015) u klíštěte *Amblyomma cajennense* identifikovali PGE<sub>2</sub> ve slinách v koncentraci 80 ng/ml. Zjistili, že PGE<sub>2</sub> má vliv na diferenciaci dendritických buněk. Ve své práci preinkubovali DCs s klíštěcími slinami v různých koncentracích a maturaci DCs stimulovali LPS (100 ng/ml) po dobu 18 h. Data ukázala významné snížení IL-12p40, IL-6 a TNF- $\alpha$  (až o 90 %). Byla prokázána i signifikantní produkce IL-10 vyvolaná slinami (1:10 zředěné sliny vyvolaly až šestinásobné navýšení). U nezralých a aktivovaných DCs, které byly rovněž preinkubovány se slinami, byla prokázána snížená schopnost exprese receptoru CCR5 (receptor pro chemokin RANTES) nebo CCR7 (receptor pro MIP-3 $\beta$ ). Sliny tohoto klíštěte zároveň inhibovaly expresi molekul CD40 a CD86 u zralých DCs, zatímco iniciovaly expresi molekuly PD-L1 (Programmed death-ligand 1), která byla nejvyšší u buněk inkubovaných se slinami bez LPS.

Ve slinách klíštěte *Rhiphicephalus sanguineus* byl identifikován jak adenosin (110 pmol/ $\mu$ l), tak PGE<sub>2</sub> (100 nM). Obě molekuly v DCs inhibují cytokinovou produkci ovlivněním cAMP-PKA signalizace. Oliveira et al., (2011) použili ve své práci PKA inhibitor H-89 (3  $\mu$ M), aby dokázali, že je schopen blokovat imunosupresivní účinky těchto látek. Jejich data potvrdila, že H-89 signifikantně, ale nikoli úplně, zvrátil inhibiční vlivy

PGE<sub>2</sub> a adenosinu. U PGE<sub>2</sub> se prokázalo, že je zároveň diferenciačním inhibítoem DCs v kostní dřeni. Pokud DCs diferencují v přítomnosti PGE<sub>2</sub>, produkují vysoké hladiny protizánětlivých cytokinů a indukují imunitní odpověď ve směru Th2 (Subauste, 2009). Rovněž zjistili, že adenosin je inhibítoem produkce prozánětlivých cytokinů IL-12p40 a TNF- $\alpha$  a současně stimuluje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10.

V naší práci bylo zjištěno, že sliny klíštěte *Ixodes ricinus* obsahují pouze jednu nízkomolekulární imunomodulační látku, a to prostaglandin E<sub>2</sub> (7 ng/ml). Je to zatím nejnížší množství PGE<sub>2</sub>, které bylo doposud u klíšťat stanoveno. Potvrdili jsme, že klíštěcí sliny výrazně inhibují produkci prozánětlivých cytokinů. Nicméně za tuto inhibici jsou primárně zodpovědné proteiny obsažené v klíštěcích slinách. Např. protein Iris ve spolupráci s jinými proteiny je zodpovědný za snížení produkce TNF- $\alpha$  (Leboulle et al., 2002; Prevot et al., 2009). PGE<sub>2</sub> ale může rovněž kooperovat s funkcemi imunomodulačních proteinů, a přispívat tak k potlačení produkce cytokinů, ovšem nikoli tak významně jako PGE<sub>2</sub> u jiných klíšťat, např. u *Dermacentor variabilis* (Poole et al., 2013).

Nepodařilo se nám jednoznačně prokázat efekt PKA inhibítoem H-89 na prostaglandinem E<sub>2</sub> vyvolanou supresi produkce TNF- $\alpha$ . Po 24h inkubaci nedošlo k blokaci imunosupresivního účinku této látky (ale jen po 4 h). Jedním z možných důvodů proč H-89 neinhiboval PGE<sub>2</sub> po celou dobu pokusu je skutečnost, že tento cytokin je produkován makrofágy velmi rychle (20 minut), jeho produkce trvá kratší dobu (2-12 hodin), zatímco jiné cytokiny se po stimulaci objevují později (Shurety et al., 2000).

Inhibítoem H-89 ve slinách zřejmě potlačil PGE<sub>2</sub> aktivitu, ale vzhledem k jeho nízké koncentraci neměla blokace signifikantní vliv (sliny dál inhibovaly).

V budoucnu, v případě opakování pokusů, by mohl být použit jiný typ buněk, např. dendritické buňky, které byly použity téměř ve všech publikovaných pracech. Rovněž by měla být provedena titrace H-89 a standardního PGE<sub>2</sub>, aby byly co nejpřesněji určeny jejich účinné koncentrace. Zároveň by mohl být znovu analyzován PGE<sub>2</sub>, ale ihned po odběru klíštěcích slin.

## 7 ZÁVĚR

- Byla vypracována literární rešerše o nízkomolekulárních imunomodulátorech v klíštěcích slinách.
- Ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* byl stanoven obsah prostaglandinu E<sub>2</sub> (7 ng/ml).
- Adenosin v klíštěcích slinách *I. ricinus* prokázán nebyl.
- Použitím standardního PGE<sub>2</sub> byly ověřeny inhibiční vlastnosti této nízkomolekulární látky v supresi produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnými liniemi IC-21 a PMJ-2R. Podařilo se prokázat, že v prvních 4 hodinách PKA inhibitor H-89 blokuje inhibiční vlastnosti PGE<sub>2</sub>. Jeho efekt na potlačení PGE<sub>2</sub> přítomného ve slinách *I. ricinus* potvrzen nebyl. Rovněž se ukázalo, že klíštěcí sliny vykazovaly na produkci cytokinů silnější inhibiční účinek než PGE<sub>2</sub>. Sliny klíštěte *I. ricinus* tedy moduluji imunitní reakce svého hostitele pomocí proteinových látek obsažených ve slinách a jejich vzájemné kooperace, např. protein Iris, IRAC paralogy nebo SALP 15.

## 8 SEZNAM LITERATURY

**Abdel-Majid, R. M., & Marshall, J. S.** (2004). Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1227-1236.

**Alarcon-Chaidez, F. J., Müller-Doblies, U. U., & Wikel, S.** (2003). Characterization of a recombinant immunomodulatory protein from the salivary glands of *Dermacentor andersoni*. *Parasite Immunology*, 25(2), 69-77.

**Aljamali, M., Bowman, A. S., Dillwith, J. W., Tucker, J. S., Yates, G. W., Essenberg, R. C., & Sauer, J. R.** (2002). Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(3), 331-341.

**Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., & Fikrig, E.** (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, 16(6), 849-859.

**Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G.** (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 842-857.

**Antonioli, L., Csóka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kókai, E., Blandizzi, C., & Haskó, G.** (2014). Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discovery Today*, 19(8), 1051-1068.

**Antuch, W., Güntert, P., Billeter, M., Hawthorne, T., Grossenbacher, H., & Wüthrich, K.** (1994). NMR solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (rTAP), a factor Xa inhibitor from the tick *Ornithodoros moubata*. *FEBS letters*, 352(2), 251-257.

**Aronoff, D. M., Canetti, C., & Peters-Golden, M.** (2004). Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *The Journal of Immunology*, 173(1), 559-565.

**Ballinger, M. N., Aronoff, D. M., McMillan, T. R., Cooke, K. R., Olkiewicz, K., Toews, G. B., Peters-Golden, M., & Moore, B. B.** (2006). Critical role of prostaglandin E2 overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation. *The Journal of Immunology*, 177(8), 5499-5508.

**Banchereau, J., & Steinman, R. M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.

**Bankhurst, A. D.** (1982). The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 7(2), 85-91.

**Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prévot, P. P., Santini, S., Basseur, R., Brossard, M., Bureau, F., Heinen, E., & Vanhaeverbeek, M.** (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PloS One*, 3(12), e3987.

- Bergman, D. K., Ramachandra, R. N., & Wikel, S. K.** (1995). *Dermacentor andersoni*: salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to concanavalin A in vitro. *Experimental Parasitology*, 81(3), 262-271.
- 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.
- Betz, M., & Fox, B. S.** (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *The Journal of Immunology*, 146(1), 108-113.
- Beutler, B.** (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 43(3), 227-235.
- Bizzarro, B., Barros, M. S., Maciel, C., Gueroni, D. I., Lino, C. N., Campopiano, J., Kotsyfakis, M., Amarante-Mendes, G. P., Calvo, E., Capurro, M. L., & Sá-Nunes, A.** (2013). Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. *Parasites & Vectors*, 6(1), 1.
- Boison, D., Chen, J. F., & Fredholm, B. B.** (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death & Differentiation*, 17(7), 1071-1082.
- Boldbaatar, D., Sikasunge, C. S., Battsetseg, B., Xuan, X., & Fujisaki, K.** (2006). Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 25-36.
- Borea, P. A., Gessi, S., Bar-Yehuda, S., & Fishman, P.** (2009). A3 adenosine receptor: pharmacology and role in disease. In *Adenosine Receptors in Health and Disease* (pp. 297-327). Springer Berlin Heidelberg.
- Boyd, W. C., & Shapleigh, E.** (1954). Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *The Journal of Immunology*, 73(4), 226-231.
- Bowman, A. S., Gengler, C. L., Surdick, M. R., Zhu, K., Essenberg, R. C., Sauer, J. R., & Dillwith, J. W.** (1997). A novel phospholipase A 2 activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Experimental Parasitology*, 87(2), 121-132.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braun, D., Longman, R. S., & Albert, M. L.** (2005). A two-step induction of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*, 106(7), 2375-2381.
- Brown, S. J., & Askenase, P. W.** (1985). *Amblyomma americanum*: requirement for host Fc receptors in antibody-mediated acquired immune resistance to ticks. *Experimental Parasitology*, 59(2), 248-256.
- Budayová, E., a kol.** (2004). Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii. ISBN 80-903414-0-3.

- Campbell, D. J., Kim, C. H., & Butcher, E. C.** (2003). Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunological Reviews*, 195(1), 58-71.
- Carini, C., Hudspith, B. N., & Brostoff, J.** (1981). Effect of prostaglandins and cyclic nucleotides on growth and immunoglobulin secretion of two IgE myeloma cell lines. *British Journal of Cancer*, 43(3), 257.
- Carvalho-Costa, T. M., Mendes, M. T., da Silva, M. V., da Costa, T. A., Tiburcio, M. G. S., Anhô, A. C. B. M., Rodrigues, Jr., V. & Oliveira, C. J. F.** (2015). Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1.
- Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J. M. C., Mares, M., Kopecky, J., & Kotsyfakis, M.** (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*, 117(2), 736-744.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J. H., Francischetti, I. M., & Kotsyfakis, M.** (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3842-3854
- Cheng, Y., Wu, H., & Li, D.** (1999). An inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. *Science in China Series C: Life Sciences*, 42(5), 457-464.
- Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotheaux, B., Decrem, Y., Prévot, P. P., Brossard, M., Godfroid, E., & Vanhamme, L.** (2008). Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One*, 3(1), e1400.
- Csóka, B., Németh, Z. H., Virág, L., Gergely, P., Leibovich, S. J., Pacher, P., Sun, C. X., Blackburn, M. R., Vizi, S. E., Deitchand, E. A., & Haskó, G.** (2007). A2A adenosine receptors and C/EBP $\beta$  are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood*, 110(7), 2685-2695.
- Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., & Fikrig, E.** (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001205.
- Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F. S., & Fikrig, E.** (2001). Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1056-1064.
- Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., Frère, J. M., Feron, O., Dogné, J. M., Dessy, C., Godfroid, E., & Vanhamme, L.** (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2381-2395.
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A. L., Dias, J. M., Coelho, F. M., Russo, R. C., Ferreira, B. R., Graham, G. J., Shaw, J. P., Wells, T. N. C., Teixeira, M. M., Power, C. A., & Proudfoot, A. E. I.** (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2019-2031.



- Dickinson, R. G., O'Hagan, J. E., Schotz, M., Binnington, K. C., & Hegarty, M. P.** (1976). Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 54(5), 475-486.
- Doyen, V., Rubio, M., Braun, D., Nakajima, T., Abe, J., Saito, H., & Sarfati, M.** (2003). Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(8), 1277-1283.
- D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., & Plow, E. F.** (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 246-250.
- Durand, E. M., & Zon, L. I.** (2010). Newly emerging roles for prostaglandin E2 regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem cell engraftment. *Current Opinion in Hematology*, 17(4), 308-312.
- Eltzschig, H. K., Thompson, L. F., Karhausen, J., Cotta, R. J., Ibla, J. C., Robson, S. C., & Colgan, S. P.** (2004). Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*, 104(13), 3986-3992.
- Erdmann, A. A., Gao, Z. G., Jung, U., Foley, J., Borenstein, T., Jacobson, K. A., & Fowler, D. H.** (2005). Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood*, 105(12), 4707-4714.
- Ferreira, B. R., & Silva, J. S.** (1999). Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology-Oxford*, 96, 434-439.
- Ferreira, C. A. S., Vaz, I. D. S., da Silva, S. S., Haag, K. L., Valenzuela, J. G., & Masuda, A.** (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, 101(1), 25-34.
- Fezza, F., Dillwith, J. W., Bisogno, T., Tucker, J. S., Di Marzo, V., & Sauer, J. R.** (2003). Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulation, in the salivary glands of the lone star tick. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1633(1), 61-67.
- Fields, W. S.** (1991). The history of leeching and hirudin. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 21(Suppl. 1), 3-10.
- Frauschuh, A., Power, C. A., Déruaz, M., Ferreira, B. R., Silva, J. S., Teixeira, M. M., Dias, J. M., Martin, T., Wells, T. N. C., & Proudfoot, A. E.** (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.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99(10), 3602-3612.

- 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(4), 869-875.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost*, 91(5), 886-898.
- Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mans, B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., Lane, R. S., & Ribeiro, J. M.** (2005). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(10), 1142-1161.
- Fredholm, B. B.** (2010). Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1284-1288.
- Fredholm, B. B., Johansson, S., & Wang, Y. Q.** (2011). Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Advances in Pharmacology*, 61, 77.
- Frick, J. S., MacManus, C. F., Scully, M., Glover, L. E., Eltzschig, H. K., & Colgan, S. P.** (2009). Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4957-4964.
- Fujino, H., Salvi, S., & Regan, J. W.** (2005). Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Molecular Pharmacology*, 68(1), 251-259.
- Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J. K., Fikrig, E., Yengo, C. M., & Anguita, J.** (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology*, 177(10), 6579-6583.
- 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.
- Gomi, K., Zhu, F. G., & Marshall, J. S.** (2000). Prostaglandin E2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 165(11), 6545-6552.
- Gordon, J. R., & Allen, J. R.** (1991). Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *The Journal of Parasitology*, 167-170.
- Goto, T. O. S. H. I. O., Herberman, R. B., Maluish, A., & Strong, D. M.** (1983). Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. *The Journal of Immunology*, 130(3), 1350-1355.
- Grubhoffer, L., & Jindrak, L.** (1998). Lectins and tick-pathogen interactions: a minireview. *Folia Parasitologica*, 45(1), 9-13.

- Grubhoffer, L., Kovar, V., & Rudenko, N.** (2004). Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology*, *129*(S1), S113-S125.
- Guo, X., Booth, C. J., Paley, M. A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S., & Montgomery, R. R.** (2009). Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infection and Immunity*, *77*(6), 2320-2329.
- Gustafsson, K., Ingelsten, M., Bergqvist, L., Nyström, J., Andersson, B., & Karlsson-Parra, A.** (2008). Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. *Cancer Research*, *68*(14), 5965-5971.
- Hale, A. H., Evans, D. L., & Daniel, L. W.** (1982). Effect of prostaglandins on elicitation of anti-viral cytolytic activity. *Immunology Letters*, *4*(3), 171-174.
- 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 burgdorferi* transmission. *Immunology*, *113*(3), 401-408.
- Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J. F., & Gualde, N.** (2002). Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *The Journal of Immunology*, *168*(5), 2255-2263.
- Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Nishikawa, Y., Xuan, X., & Fujisaki, K.** (2007). Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *147*(1), 93-101.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P.** (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, *23*(3), 144-150.
- Haskó, G., Szabo, C., Németh, Z. H., Kvetan, V., Pastores, S. M., & Vizi, E. S.** (1996). Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *The Journal of Immunology*, *157*(10), 4634-4640.
- Haskó, G., Kuhel, D. G., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Deitch, E. A., Mabley, J. G., Marton, A., & Szabó, C.** (2000). Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *The FASEB Journal*, *14*(13), 2065-2074.
- Haskó, G., & Cronstein, B. N.** (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, *25*(1), 33-39.
- Haskó, G., & Pacher, P.** (2012). Regulation of macrophage function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(4), 865-869.
- Haskó, G., & Cronstein, B.** (2013). Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol*, *4*, 85.
- Hata, A. N., & Breyer, R. M.** (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics*, *103*(2), 147-166.

- Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N., & Fujisaki, K.** (2006). Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *International Journal for Parasitology*, *36*(10), 1123-1132.
- Hatta, T., Tsuji, N., Miyoshi, T., Alim, M. A., Islam, M. K., & Fujisaki, K.** (2009). Leucine aminopeptidase in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*: endogenous expression profiles in midgut. *Journal of Veterinary Medical Science*, *71*(5), 589-594.
- Hatta, T., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M. K., Alim, M. A., Yamaji, K., & Fujisaki, K.** (2010). Leucine aminopeptidase, HILAP, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays vital roles in the development of oocytes. *Parasitology International*, *59*(2), 286-289.
- Headrick, J. P., Ashton, K. J., Rose'Meyer, R. B., & Peart, J. N.** (2013). Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacology & Therapeutics*, *140*(1), 92-111.
- Heusinkveld, M., van Steenwijk, P. J. D. V., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T. H., Gorter, A., Welters, M. J., van Hall, T., & van der Burg, S. H.** (2011). M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *The Journal of Immunology*, *187*(3), 1157-1165.
- Hojgaard, A., Biketov, S. F., Shtannikov, A. V., Zeidner, N. S., & Piesman, J.** (2009). Molecular identification of Salp15, a key salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, *46*(6), 1458-1463.
- Hovius, J. W. R., Ramamoorthi, N., Van't Veer, C., De Groot, K. A., Nijhof, A. M., Jongejan, F., van Dam, A. P., & Fikrig, E.** (2007). Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *7*(3), 296-303.
- Hovius, J. W., de Jong, M. A. P., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S. I., & Geijtenbeek, T. B.** (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog*, *4*(2), e31.
- Hu, Z. Q., Asano, K., Seki, H., & Shimamura, T.** (1995). An essential role of prostaglandin E on mouse mast cell induction. *The Journal of Immunology*, *155*(4), 2134-2142.
- Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., & Chinzei, Y.** (2003). Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *European Journal of Biochemistry*, *270*(9), 1926-1934.
- Islam, M. K., Anisuzzaman, Alim, M. A., Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., & Tsuji, N.** (2011). Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathog*, *7*(3), e1001312.
- Jaworski, D. C., Jasinskas, A., Metz, C. N., Bucala, R., & Barbour, A. G.** (2001). Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect molecular biology*, *10*(4), 323-331.

- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., & Enk, A. H.** (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*, 27(12), 3135-3142.
- Joshi, P. C., Zhou, X., Cuchens, M., & Jones, Q.** (2001). Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common  $\gamma$ -chain. *The Journal of Immunology*, 166(2), 885-891.
- Juncadella, I. J., Garg, R., Ananthnarayanan, S. K., Yengo, C. M., & Anguita, J.** (2007). T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(3), 433-438.
- Kaewhom, P., Stich, R. W., Needham, G. R., & Jittapalapong, S.** (2008). Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 53-57.
- Kalinski, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdewint, F. G., & Kapsenberg, M. L.** (1997). IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *The Journal of Immunology*, 159(1), 28-35.
- Kaliński, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M., & Kapsenberg, M. L.** (1998). Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a<sup>+</sup> CD83<sup>+</sup> dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *The Journal of Immunology*, 161(6), 2804-2809.
- Kaliński, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., & Kapsenberg, M. L.** (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today*, 20(12), 561-567.
- Kalinski, P.** (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, 188(1), 21-28.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6702-6708.
- Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., & Chinzei, Y.** (2005). Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thromb Haemost*, 93(2), 359-367.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C.** (2013). Structure-function of the G-protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 531.
- Kazimírová, M., Jančinová, V., Petříková, M., Takáč, P., Labuda, M., & Nosál, R.** (2003). An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). In *Ticks and Tick-Borne Pathogens* (pp. 97-105). Springer Netherlands.

- Kazimírová, M., Koh, C. Y., & Kini, R. M.** (2010). Tiny Ticks are Vast Sources of Antithrombotic Factors. In *Toxins and Hemostasis* (pp. 113-130). Springer Netherlands.
- Keller, P. M., Waxman, L., Arnold, B. A., Schultz, L. D., Condra, C., & Connolly, T. M.** (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5450-5456.
- Khayrullina, T., Yen, J. H., Jing, H., & Ganea, D.** (2008). In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *The Journal of Immunology*, 181(1), 721-735.
- Kim, J. G., & Hahn, Y. S.** (2000). IFN- $\gamma$  Inhibits the Suppressive Effects of PGE2 on the Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  by Mouse Macrophages. *Immunological Investigations*, 29(3), 257-269.
- Klouda, P.** (2003). Moderní analytické metody. ISBN 80-86369-07-2.
- Koh, C. Y., Kazimirova, M., Trimmell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P. A., & Kini, R. M.** (2007). Variegain, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29101-29113.
- Koh, C. Y., & Kini, R. M.** (2009). Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thromb Haemost*, 102(3), 437-453.
- Kolenko, V., Rayman, P., Roy, B., Cathcart, M. K., O'Shea, J., Tubbs, R., Rybicki, L., Bukowski, R., & Finke, J.** (1999). Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood*, 93(7), 2308-2318.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, H. F. J., Kotsyfakis, M. & Chmelař, J.** (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58-68.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M.** (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26298-26307.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2007). Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29256-29263.
- 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 Microbiology*, 77(2), 456-470.
- Kovář, V., Kopáček, P., & Grubhoffer, L.** (2000). Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), 195-205.
- Kumar, V.** (2013). Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signalling*, 9(2), 145-165.

- Kunkel, S. L., Spengler, M., May, M. A., Spengler, R., Larrick, J., & Remick, D.** (1988). Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5380-5384.
- Labíková, Jana.** (2011). Th17 lymphocytes and autoimmunity diseases with the intention of diabetes 1. Type.
- Lala, P. K., Kennedy, T. G., & Parhar, R. S.** (1988). Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua: II. Characterization of the suppressor mechanisms. *Cellular Immunology*, 116(2), 411-422.
- Lambeau, G., & Lazdunski, M.** (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A 2. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(4), 162-170.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10083-10089.
- Lee, J. Y., Jhun, B. S., Oh, Y. T., Lee, J. H., Choe, W., Baik, H. H., Ha, J., Yoon, K. S., Kim, S. S., & Kang, I.** (2006). Activation of adenosine A 3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF- $\kappa$ B activation in murine BV2 microglial cells. *Neuroscience Letters*, 396(1), 1-6.
- Limo, M. K., Voigt, W. P., Tumbo-Oeri, A. G., Njogu, R. M., & Ole-MoiYoi, O. K.** (1991). Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Experimental Parasitology*, 72(4), 418-429.
- Linden, J., & Cekic, C.** (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2097-2103.
- Liu, Z., Liu, H., Liu, X., & Wu, X.** (2008). Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(4), 557-561.
- Lloyd, H. G. E., & Fredholm, B. B.** (1995). Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochemistry International*, 26(4), 387-395.
- Mailliard, R. B., Alber, S. M., Shen, H., Watkins, S. C., Kirkwood, J. M., Herberman, R. B., & Kalinski, P.** (2005). IL-18 induced CD83+ CCR7+ NK helper cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 941-953.
- Mans, B. J., Gaspar, A. R. M. D., Louw, A. I., & Neitz, A. W. H.** (1998). Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental & Applied Acarology*, 22(6), 353-366.
- Mans, B. J., Louw, A. I., & Neitz, A. W.** (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21371-21378.

- Mans, B. J., Louw, A. I., & Neitz, A. W.** (2003). The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Molecular Biology and Evolution*, 20(7), 1158-1167.
- Monteiro, R. Q., Rezaie, A. R., Ribeiro, J. M., & Francischetti, I. M.** (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochemical Journal*, 387(3), 871-877.
- Montinaro, A., Iannone, R., Pinto, A., & Morello, S.** (2013). Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacological Research*, 76, 34-40.
- Montfort, W. R., Weichsel, A., & Andersen, J. F.** (2000). Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1), 110-118.
- Muller-Haegle, S., Muller, L., & Whiteside, T. L.** (2014). Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(7), 897-914.
- Mundell, S., & Kelly, E.** (2011). Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(5), 1319-1328.
- Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T. A., Schadendorf, D., & Kalinski, P.** (2010). PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*, 116(9), 1454-1459.
- Nagamatsu, T., & Schust, D. J.** (2010). Review: The Immunomodulatory Roles of Macrophages at the Maternal-Fetal Interface. *Reproductive Sciences*, 17(3), 209-218.
- Nakayama, T., Mutsuga, N., Yao, L., & Tosato, G.** (2006). Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *Journal of Leukocyte biology*, 79(1), 95-104.
- Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., & Fikrig, E.** (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 641-650.
- Narasimhan, S., Montgomery, R. R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J. F., Sauer, J. H., Cappello, M., Kantor, F. S. & Fikrig, E.** (2004). Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1141-1146.
- Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., DePonte, K., Marcantonio, N., Koski, R. A., Anderson, J. F., Kantor, F., & Fikrig, E.** (2007). A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host & Microbe*, 2(1), 7-18.
- Narumi, S., Finke, J. H., & Hamilton, T. A.** (1990). Interferon gamma and interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 7036-7041.



- Nataraj, C., Thomas, D. W., Tilley, S. L., Nguyen, M., Mannon, R., Koller, B. H., & Coffman, T. M.** (2001). Receptors for prostaglandin E<sub>2</sub> that regulate cellular immune responses in the mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1229-1235.
- Németh, Z. H., Leibovich, S. J., Deitch, E. A., Sperlágh, B., Virág, L., Vizi, E. S., Szabó, C., & Haskó, G.** (2003). Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 883-888.
- Németh, Z. H., Lutz, C. S., Csóka, B., Deitch, E. A., Leibovich, S. J., Gause, W. C., Tone, M., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G.** (2005). Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A<sub>2B</sub> receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *The Journal of Immunology*, 175(12), 8260-8270.
- Nienaber, J., Gaspar, A. R. M., & Neitz, A. W. H.** (1999). Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology*, 93(2), 82-91.
- Nishigaki, N., Negishi, M., & Ichikawa, A.** (1996). Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub>, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular Pharmacology*, 50(4), 1031-1037.
- Novotný, J.** (2014). [Adenosine and its role in physiology]. *Ceskoslovenska Fysiologie/Ustredni Ustav Biologicky*, 64(1), 35-44.
- Nowak, M., Lynch, L., Yue, S., Ohta, A., Sitkovsky, M., Balk, S. P., & Exley, M.** (2010). The A<sub>2a</sub>R adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells. *European Journal of Immunology*, 40(3), 682-687.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Lesnock, J., Edwards, R. P., & Kalinski, P.** (2011). Positive feedback between PGE<sub>2</sub> and COX<sub>2</sub> redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 118(20), 5498-5505.
- Oliveira, C. J. F., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 10960-10969.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., & Stuart, D. I.** (1999). Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular Cell*, 3(5), 661-671.
- Parhar, R. S., & Lala, P. K.** (1988). Prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 44.
- Parizi, L. F., Rech, H., Ferreira, C. A. S., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., Masuda, A., & da Silva Vaz, I.** (2009). Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Veterinary Parasitology*, 164(2), 282-290.

- Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B.** (2006). Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthases. *Clinical Immunology*, 119(3), 229-240.
- Phipps, R. P., Stein, S. H., & Roper, R. L.** (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology Today*, 12(10), 349-352.
- Plaut, M., Marone, G., & Gillespie, E.** (1983). The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes. II. Sequential changes during culture in responsiveness of cytotoxic lymphocytes to cyclic AMP-active agents. *The Journal of Immunology*, 131(6), 2945-2952.
- Poole, N. M., Mamidanna, G., Smith, R. A., Coons, L., & Cole, J.** (2013). Prostaglandin E<sub>2</sub> in tick saliva regulates host cell migration and cytokine profile. *The FASEB Journal*, 27(1\_MeetingAbstracts), lb436.
- Preston, S. G., Majtán, J., Kouremenou, C., Rysnik, O., Burger, L. F., Cruz, A. C., Guzman, M. C., Nunn, M. A., Paesen, G. C., Nuttall, P. A., & Austyn, J. M.** (2013). Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS Pathog*, 9(6), e1003450.
- Prevot, P. P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., Benoit, A., Brossard, M., Basseur, R., Boudjeltia, K. Z., Godfroid, E., & Vanhamme, L.** (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS Journal*, 276(12), 3235-3246.
- Qian, Y., Yuan, J., Essenberg, R. C., Bowman, A. S., Shook, A. L., Dillwith, J. W., & Sauer, J. R.** (1998). Prostaglandin E<sub>2</sub> in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(4), 221-228.
- Regan, J. W., Bailey, T. J., Pepperl, D. J., Pierce, K. L., Bogardus, A. M., Donello, J. E., Fairbairn, C. E., Kedzie, K. M., Woodward, D. F., & Gil, D. W.** (1994). Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. *Molecular Pharmacology*, 46(2), 213-220.
- Rego, R. O., Hajdušek, O., Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L., & Hypša, V.** (2005). Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(9), 991-1004.
- Rego, R. O., Kopáček, P., Weise, C., Man, P., Šauman, I., & Grubhoffer, L.** (2006). The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 291-299.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., & Spielman, A.** (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of Experimental Medicine*, 161(2), 332-344.
- Ribeiro, J. C., Endris, T. M., & Endris, R.** (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 100(1), 109-112.

- Ribeiro, J. C., Evans, P. M., MacSwain, J. L., & Sauer, J.** (1992). *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Experimental Parasitology*, 74(1), 112-116.
- Ribeiro, J. M., & Mather, T. N.** (1998). *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, 89(2), 213-221.
- Ribeiro, J. M., Charlab, R., & Valenzuela, J. G.** (2001). The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 204(11).
- Ribeiro, J. M. C., & Modi, G.** (2001). The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and *Brunetti*, the main vector of human kala-azar. *Journal of Parasitology*, 87(4), 915-917.
- Rieser, C., Böck, G., Klocker, H., Bartsch, G., & Thurnher, M.** (1997). Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor  $\alpha$  cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1603-1608.4.
- Rincón, M., Tugores, A., López-Rivas, A., Silva, A., Alonso, M., De Landázuri, M. O., & López-Botet, M.** (1988). Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *European Journal of Immunology*, 18(11), 1791-1796.
- Rivest, S.** (2010). Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Progress in Brain Research*, 181, 43-53.
- Sachdeva, S., & Gupta, M.** (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(3), 245-253.
- Sangamnatdej, S., Paesen, G. C., Slovak, M., & Nuttall, P. A.** (2002). A high affinity serotonin-and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Molecular Biology*, 11(1), 79-86.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., & Francischetti, I. M.** (2007). Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1497-1505.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L. R., Choi, E. Y., Francischetti, I. M., Andersen, J. F., Shi, G. P., Chavakis, T., Ribeiro, J. M., & Kotsyfakis, M.** (2009). The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7422-7429.
- Sharma, S., Stolina, M., Yang, S. C., Baratelli, F., Lin, J. F., Atianzar, K., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Huang, M., Dohadwala, M., Batra, R. K., & Dubinett, S. M.** (2003). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clinical Cancer Research*, 9(3), 961-968.

- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V.** (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 2024-2052.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renauld, J. C., & Vanderplasschen, A.** (2007). The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and Infection*, *9*(2), 247-250.
- Schuijt, T. J., Bakhtiari, K., Daffre, S., DePonte, K., Wielders, S. J., Marquart, J. A., Hovius, J. W., van der Poll, T., Fikrig, E., Bunce, M. W., Camire, R. M., Nicolaes, G. A. F., Meijers, J. C. M. & vant ' Veer, C.** (2013). Factor Xa Activation of Factor V Is of Paramount Importance in Initiating the Coagulation System Lessons From a Tick Salivary Protein. *Circulation*, *128*(3), 254-266.
- Schulte, G., & Fredholm, B. B.** (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*, *15*(9), 813-827.
- Simkin, N. J., Jelinek, D. F., & Lipsky, P. E.** (1987). Inhibition of human B cell responsiveness by prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, *138*(4), 1074-1081.
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D. A., & Stow, J. L.** (2000). Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *20*(4), 427-438.
- Smith, R. J.** (1977). Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of nonsteroid anti-inflammatory agents and prostaglandins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *200*(3), 647-657.
- Snijdwint, F. G., Kaliński, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D., & Kapsenberg, M. L.** (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *150*(12), 5321-5329.
- Sombroek, C. C., Stam, A. G., Masterson, A. J., Lougheed, S. M., Schakel, M. J., Meijer, C. J., Pinedo, H. M., van den Eerwegh, A. J. M., Scheper, R. J. & de Gruijl, T. D.** (2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *The Journal of Immunology*, *168*(9), 4333-4343.
- Specht, C., Bexten, S., Kölsch, E., & Pauels, H. G.** (2001). Prostaglandins, but not tumor-derived IL-10, shut down concomitant tumor-specific CTL responses during murine plasmacytoma progression. *International Journal of Cancer*, *91*(5), 705-712.
- Steen, N. A., Barker, S. C., & Alewood, P. F.** (2006). Proteins in the saliva of the *Ixodida* (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon*, *47*(1), 1-20.
- Stutzer, C., Mans, B. J., Gaspar, A. R., Neitz, A. W., & Maritz-Olivier, C.** (2009). *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Experimental Parasitology*, *122*(4), 318-327.
- Subauste, C. S.** (2009, October). CD40 and the immune response to parasitic infections. *In Seminars in Immunology* (Vol. 21, No. 5, pp. 273-282). Academic Press.

- Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., & Narumiya, S.** (1992). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 267(10), 6463-6466.
- Sugimoto, Y., & Narumiya, S.** (2007). Prostaglandin E receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11613-11617.
- Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzhig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F. & Colgan, S. P.** (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 993-1002.
- Treffkorn, L., Scheibe, R., Maruyama, T., & Dieter, P.** (2004). PGE 2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- $\alpha$ , ET-1, IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 74(1), 113-123.
- Trincavelli, M. L., Daniele, S., & Martini, C.** (2010). Adenosine receptors: what we know and what we are learning. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(9), 860-877.
- Tsuji, N., Kamio, T., Isobe, T., & Fujisaki, K.** (2001). Molecular characterization of a peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Molecular Biology*, 10(2), 121-129.
- 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.
- Tyson, K. R., Elkins, C., & de Silva, A. M.** (2008). A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *The Journal of Immunology*, 180(6), 3964-3968.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), 18717-18723.
- Valenzuela, J. G.** (2004). Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, 129(S1), S83-S94.
- van de Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., & Huber, R.** (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *The EMBO Journal*, 15(22), 6011.
- van der Putten, C., Zuiderwijk-Sick, E. A., van Straalen, L., de Geus, E. D., Boven, L. A., Kondova, I., IJzerman, A. P., & Bajramovic, J. J.** (2009). Differential expression of adenosine A3 receptors controls adenosine A2A receptor-mediated inhibition of TLR responses in microglia. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7603-7612.
- Van der Pouw Kraan, T. C., Boeije, L. C., Smeenk, R. J., Wijdenes, J., & Aarden, L. A.** (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(2), 775-779.

- Walker, C., Kristensen, F., & Bettens, F.** (1983). Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *The Journal of Immunology*, *130*(4), 1770-1773.
- Walker, W., & Rotondo, D.** (2004). Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12-and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- $\gamma$  synthesis. *Immunology*, *111*(3), 298-305.
- Wang, X., Coons, L. B., Taylor, D. B., Stevens, S. E., & Gartner, T. K.** (1996). Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(30), 17785-17790.
- Wang, H., Paesen, G. C., Nuttall, P. A., & Barbour, A. G.** (1998). Male ticks help their mates to feed. *Nature*, *391*, 753-754.
- Wang, X. S., & Lau, H. Y. A.** (2006). Prostaglandin E2 potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy*, *61*(4), 503-506.
- Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., & Ichikawa, A.** (1993). Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20175-20178.
- Watchmaker, P. B., Berk, E., Muthuswamy, R., Mailliard, R. B., Urban, J. A., Kirkwood, J. M., & Kalinski, P.** (2010). Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8+ T cell expansion by dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *184*(2), 591-597.
- Waxman, L., Smith, D. E., Arcuri, K. E., & Vlasuk, G. P.** (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, *248*(4955), 593-596.
- Weller, C. L., Collington, S. J., Hartnell, A., Conroy, D. M., Kaise, T., Barker, J. E., Wilson, M. A., Taylor, G. W., Jose, P. J., & Williams, T. J.** (2007). Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(28), 11712-11717.
- Werner, S., & Grose, R.** (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, *83*(3), 835-870.
- Wilson, J. M., Kurtz, C. C., Black, S. G., Ross, W. G., Alam, M. S., Linden, J., & Ernst, P. B.** (2011). The A2B adenosine receptor promotes Th17 differentiation via stimulation of dendritic cell IL-6. *The Journal of Immunology*, *186*(12), 6746-6752.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, H., Yang, H., Ma, D., Li, J., Li, D., Lai, R., & Yu, H.** (2010). Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(22), 16606-16613.
- Xu, X., Yang, H., Ma, D., Wu, J., Wang, Y., Song, Y., & Lai, R.** (2008). Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling

- proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(3), 582-590.
- Yang, H., & Chen, C.** (2008). Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current Pharmaceutical Design*, 14(14), 1443.
- Yang, D., Chen, H., Koupenova, M., Carroll, S. H., Eliades, A., Freedman, J. E., Toselli, P., & Ravid, K.** (2010). A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(4), 817-827.
- Yamaji, K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Hatta, T., Alim, M. A., KUSHIBIKI, S., & FUJISAKI, K.** (2010). Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 599-604.
- Yuhki, K., Kashiwagi, H., Kojima, F., Kawabe, J., & Ushikubi, F.** (2010). Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *International Angiology: a Journal of the International Union of Angiology*, 29(2 Suppl), 19-27.
- Yu, C. L., Huang, M. H., Kung, Y. Y., Tsai, C. Y., Tsai, Y. Y., Tsai, S. T., Huang, D. F., Sun, K. H., Han, S. H., & Yu, H. S.** (1998). Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE2) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflammation Research*, 47(4), 167-173.
- Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Rees, H. H., & Lai, R.** (2006). A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides*, 27(1), 31-35.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., & Fujisaki, K.** (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides*, 28(6), 1304-1310.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., & Fujisaki, K.** (2009). Characterization of an intracellular cystatin homolog from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Veterinary Parasitology*, 160(1), 180-183.